

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LE DÉCHLORANE PLUS INDUIT UN STRESS OXYDANT ET UNE
DIMINUTION DE L'ACTIVITÉ DE LA CYCLOOXYGÉNASE CHEZ LA
MOULE BLEUE

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

PIERRE-LUC GAGNÉ

FÉVRIER 2017

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

AVANT PROPOS

Ce projet s'inscrit dans une approche expérimentale afin d'identifier les réponses de quelques biomarqueurs chez la moule bleue exposée à un retardateur de flamme (RF) polychloré, le Déchlorane plus (DP). Étant donné l'omniprésence de RF émergents dans les réservoirs biogéochimiques de la planète liée à l'utilisation croissante des RF alternatifs (e.g., le DP), dans le but de remplacer des RF aujourd'hui prohibés grâce à la réglementation (e.g., Convention de Stockholm), il importe de connaître la toxicité de ces composés chimiques de substitution. La moule bleue a été sélectionnée comme bioindicateur, puisqu'elle est une espèce filtreur et sédentaire, et qu'elle réagit suite à l'exposition à des composés organiques. De plus, étant donné le manque probant d'informations sur la toxicité du DP dans la littérature, la recherche d'indicateurs d'effets est alors opportune. Ainsi, la moule bleue a été exposée à quatre concentrations de DP: deux doses qui se situent à des niveaux environnementaux, et deux autres doses à des niveaux 10 à 100 fois plus élevées. Deux conditions d'exposition ont été retenues pour cette étude: *in vitro* et *in vivo*. Quelques biomarqueurs ont été sélectionnés pour leur importance comme indicateur de toxicité dans l'organisme à différents niveaux d'activité biologique: au niveau moléculaire (le stress oxydatif et l'activité de la cyclooxygénase), au niveau cellulaire (les dommages liés à l'ADN, la viabilité et la phagocytose des hémocytes) et au niveau physiologique (histopathologie des gonades).

REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à remercier mon directeur de recherche Jonathan Verreault de m'avoir donné l'opportunité d'entamer des recherches universitaires en écotoxicologie, un vaste sujet d'études tout à fait passionnant. Ces trois années de maîtrise ont certainement permis de tester mes capacités à tous les niveaux et d'ouvrir une fenêtre en moi dans ce champ de connaissances. En quelques sortes, comme toute transformation de soi dans le cours d'une vie, ces années de maîtrise ont permis de révéler d'autres aspects de ma personnalité et de mes compétences que je n'aurais peut-être pas pu découvrir autrement. Merci pour tes encouragements, ta disponibilité et tes judicieux conseils lorsque cela était opportun.

Je ne pourrais pas passer sous silence le travail, les encouragements et les conseils de mes deux co-directrices de recherche, i.e. Cathy Vaillancourt et Lise Parent. Merci Lise pour ta générosité. De plus, merci Cathy pour ta bonne humeur qui est certainement contagieuse ainsi que pour m'avoir permis d'accéder au laboratoire et les équipes qui m'ont entouré. Un merci particulier à Marlène Fortier, agente de recherche dans le laboratoire de Cathy Vaillancourt, qui m'a beaucoup encouragé, malgré les moments difficiles. Merci pour ta grande générosité, tant dans le déroulement du travail en laboratoire que dans le cheminement de mon projet de recherche. Avec toi, le travail en laboratoire a été définitivement plus stimulant. Je tiens aussi à remercier la précieuse implication de Marc Fraser, étudiant dans l'équipe de Cathy Vaillancourt.

Un grand merci à la belle équipe du laboratoire de Michel Fournier à l'INRS-IAF, particulièrement ses étudiants, i.e. Alexandre Beaudry et Émilie Lacaze, pour avoir

partagé et transmis avec moi leur savoir. Cela a certainement permis d'explorer de nombreuses facettes de mon projet de recherche, sans quoi, l'ampleur du travail aurait été quasi impossible à réaliser. Je tiens aussi à souligner la précieuse implication de Ling Wang, technicienne de laboratoire de Jonathan Verreault, pour ses conseils et ses encouragements.

Je tiens également à remercier la belle équipe du TOXEN, i.e. Romy, Anthony, Antoine, Chloë, Manon, Julie et Marie-Line pour leur support et leur moral indéfectibles. Votre présence inspire la motivation et l'inspiration que requiert tout travail de recherche.

Je tiens à remercier l'équipe de l'Hygiène du milieu qui travaille régulièrement avec moi à l'usine de filtration de la ville de Rosemère qui m'a soutenu dans ma démarche universitaire. Merci également à Patricia Julien, Diego Arizala et Cédric Buchanan...Vous êtes les meilleurs amis du monde. Pour terminer, je remercie la présence de ma mère, Marthe Bolduc, et de mon frère, Jean-Sébastien Gagné, pour leur soutien durant ce projet d'étude.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	x
RÉSUMÉ	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I.....	4
1.1 Revue de littérature	4
1.1.1 Généralités.....	4
1.1.2 Déchlorane Plus.....	5
1.1.3 Modèle d'étude: la moule bleue.....	10
1.1.4 Biomarqueurs d'intérêt.....	12
1.2 Objectifs et hypothèses	17
1.2.1 Objectif spécifique.....	17
1.2.2 Hypothèses.....	17
CHAPITRE II	19
DECHLORANE PLUS INDUCES OXIDATIVE STRESS AND DECREASES CYCLOOXYGENASE ACTIVITY IN THE BLUE MUSSEL.....	19
ABSTRACT	20
2.1 Introduction.....	20
2.2 Materials and methods	24
2.2.1 <i>In vivo</i> exposure	24
2.2.2 Reproductive stage and gonadal integrity	25
2.2.3 DP analysis.....	25
2.2.4 Cell viability and phagocytosis	26
2.2.5 <i>In vitro</i> exposure.....	27
2.2.6 LPO analysis	28

2.2.7 Cyclooxygenase activity	29
2.2.8 Statistical analysis	29
2.3 Results	31
2.3.1 <i>In vivo</i> exposure	31
2.3.2 <i>In vitro</i> exposure.....	33
2.3.3 LPO levels	35
2.3.4 COX activity	36
2.4 Discussion.....	37
2.4.1 Bioaccumulation of DP	37
2.4.2 Phagocytosis.....	38
2.4.3 DNA damage.....	39
2.4.4 Gills integrity and oxidative stress.....	39
2.4.5 COX activity	40
2.5 Conclusions.....	41
2.6 References	43
2.7 Supplemental data	51
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	53
BIBLIOGRAPHIE	56

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1. 1 Composés organiques polychlorés et la famille des Déchloranes (tiré de Feo <i>et al.</i> , 2012).	4
1. 2 Réaction chimique de Diels-Alder pour former le caractère stéréoisomérique du DP (à gauche) et d'autres composés de la famille des déchloranes (à droite) (tiré de Sverko <i>et al.</i> , 2011).	5
1. 3 Molécules provenant de la dégradation ou d'impuretés du DP (tiré de Sverko <i>et al.</i> , 2011).	8
1. 4 Distribution du DP tel que détectée dans les réservoirs biogéochimiques de la planète (tiré de Wang <i>et al.</i> , 2016).	7
1. 5 Distribution géographique des moules marines de l'espèce <i>mytilus</i> , selon les études écologiques (tiré de Gaitan-Espita <i>et al.</i> , 2016. doi: 10.1038/srep26853).	10
1. 6 Histopathologies examinées sur la glande digestive d'une moule méditerranéenne (<i>Mytilus galloprovincialis</i>) (note: f: fibrose; nt: nécrose). (Tiré de Cuevas et al., 2015).	11
2.1 Mean (\pm SEM) phagocytosis capacity (1 bead and more) and efficiency (3 beads and more) both expressed as % of phagocytosis activity in hemocytes of blue mussels following a 29 days <i>in vivo</i> exposure to DP.	33
2. 2 Mean (\pm SEM) phagocytosis capacity (1 bead and more) and efficiency (3 beads and more) both expressed as % of phagocytosis activity in hemocytes of blue mussels following a 3 h <i>in vitro</i> exposure with DP.	34
2. 3 Mean (\pm SEM) DNA strand breakage in blue mussel hemocytes following a 21 h <i>in vitro</i> exposure to DP.	35
2. 4 Mean (\pm SEM) LPO levels in blue mussel gill homogenates following an <i>in vivo</i> exposure to DP. The * indicates a tendency, while ** indicate a significant difference compared to the vehicle control.	36

2. 5	Mean (\pm SEM) COX activity in blue mussel gills following an <i>in vivo</i> assay with DP. The ** indicate a significant difference between treatment group and vehicle control.....	37
2. 6	Mean (\pm SEM) viability expressed as % viability of hemocytes of blue mussels following a 29 days <i>in vivo</i> exposure to DP.....	51
2. 7	Mean (\pm SEM) viability expressed as % viability of hemocytes of blue mussels following a 3 h <i>in vitro</i> exposure to DP.	52

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1. 1 Propriétés physico-chimiques du DP (tiré de Feo <i>et al.</i> , 2012; Xian <i>et al.</i> , 2011).....	10
2. 1 Concentrations (ng/g ww) of DP isomers (<i>syn</i> - and <i>anti</i> -DP) and f_{anti} in blue mussel digestive gland and muscle tissue homogenate pools exposed <i>in vivo</i> (29 days) to the DP mixture. MLOQ: 0.12 (<i>syn</i> -DP) and 0.05 ng/g ww (<i>anti</i> -DP).....	32

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

DP	Déchlorane plus/Dechlorane plus
Log K _{ow}	Coefficient de partage octanol-eau
PBDE	Polybromodiphényle éther
POP	Polluant organique persistant
RF	Retardateur de flamme
CYP	Cytochrome P450
DNA/ADN	Desoxyribonucleic acid/Acide désoxyribonucléique
COX	Cyclooxygénase/Cyclooxygenase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HAP/PAH	Hydrocarbure aromatique polycyclique/Polycyclic aromatic hydrocarbons
TBT	Tributylétain/Tributyltin
IPCS	International Programme on Chemical Safety/Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques
ROS	Reactive Oxygen Species/Dérivés Réactifs de l'Oxygène
GC/MS-ECNI	Gas Chromatography/Mass Spectroscopy- Electron-Capture Negative-Ion
MLOD	Limite de détection
MLOQ	Limite de quantification
UNEP	United Nations Environment Programme
US EPA	US Environmental Protection Agency

RÉSUMÉ

Le DP est un composé organique émergent qui est utilisé comme RF dans les produits de consommation. C'est un produit commercial qui génère une inquiétude croissante, étant donné l'observation de sa présence dans les différents réservoirs biogéochimiques de la planète. Nous avons aujourd'hui une bonne connaissance de son mode de transport dans l'environnement. Par contre, peu de recherches toxicologiques ont été engagées sur le DP. Les moules sont en général de bons indicateurs de toxicité en raison de leurs caractéristiques (i.e., ce sont des espèces filtreurs et sédentaires). En plus, elles peuvent bioaccumuler les composés organiques, provoquant différentes réponses biochimiques et physiologiques. Nous avons donc soumis la moule bleue à deux types d'expositions au DP; i.e., *in vitro* et *in vivo*, à des concentrations environnementales (0,001 et 0,01 µg de DP/L) et à des concentrations 10 à 100 fois plus élevées (0,1 et 1 µg de DP/L). Ceci, afin d'étudier les effets au niveau physiologique (histopathologie ou la possible présence de microlésions dans les gonades), cellulaire (rupture de brins d'ADN, viabilité et phagocytose des hémocytes) et moléculaire (production de peroxydation des lipides et l'activité de la cyclooxygénase dans les branchies). Ainsi, nous avons étudié la toxicité du DP sur une espèce aquatique à différents niveaux d'organisation: sur l'intégrité physiologique, sur le système immunitaire et reproductif, et sur le stress oxydatif. Les résultats de cette étude ont permis d'observer une absence de microlésions dans les gonades. De plus, aucun effet n'a été observé au niveau de la phagocytose, la viabilité cellulaire et les dommages liés à l'intégrité de l'ADN dans l'hémolymph. Par contre, l'exposition au DP a induit un stress oxydant par la peroxydation des lipides dans les branchies à une concentration environnementale (0,01 µg de DP/L) et au-delà (1,0 µg de DP/L). De plus, une diminution significative de l'activité de la cyclooxygénase à la plus forte concentration de DP utilisée (1,0 µg/L) a été constatée, toujours dans les branchies. Cela a permis de révéler le potentiel toxique du DP au niveau du stress oxydant et sur la cyclooxygénase impliquée dans le système reproducteur (i.e., dans la production de la prostaglandine qui module l'effet de la sérotonine sur la production des œufs) et le système immunitaire (i.e., l'inflammation).

Mots clés: Déchlorane Plus; moule bleue; peroxydation des lipides; cyclooxygénase; dommages à l'ADN; phagocytose

INTRODUCTION

La gestion du feu fut l'un des réquisits de la civilisation et, de nos jours, certains composés organiques synthétiques ont été inventés par les industries chimiques pour réduire la propagation du feu lors d'incendies. Ces retardateurs de flamme (RF) agissent sur l'une des quatre étapes impliquées lors de la combustion, i.e. le préchauffage, la volatilisation et la décomposition, la combustion à la propagation des flammes (Alaee *et al.*, 2003). Ces RF sont habituellement retrouvés dans les plastiques, les textiles, les câbles électroniques et tout autre matériel afin de prévenir la propagation du feu (de Wit, 2002).

Les polybromodiphényles éthers (PBDE) font partie d'une catégorie de retardateurs de flamme halogénés que nous retrouvons dans les produits de consommation, i.e., les produits de rembourrage, les équipements électroniques et électriques (Gentes *et al.*, 2012). De plus, étant donné leur persistance et leur toxicité, deux mélanges commerciaux (i.e., octa- et penta-BDE) sont maintenant bannis et se retrouvent sur la liste des polluants organiques persistants (POPs) de la Convention de Stockholm depuis 2009 (UN, 2009). Le troisième et dernier mélange commercial du PBDE (i.e., deca-BDE) a été éliminé du marché en Amérique du Nord et en Europe (EPA, 2014) depuis la fin de 2013, et le déca-BDE a été soumis pour faire partie de la liste des POPs de la convention de Stockholm (UN, 2015). Le Déchlorane plus (DP) fait partie des produits alternatifs proposés par la compagnie OxyChem (USA), en raison des similarités des propriétés chimiques entre le DP et les PBDE (e.g., déca-BDE). Anciennement utilisé comme pesticide, et plus tard comme RF sous l'appellation Déchlorane, le mirex a été banni aux États-Unis dès 1978 en raison de sa toxicité aujourd'hui bien documentée (IPCS, 1984). Ainsi, le DP a été conçu par OxyChem

pour remplacer le Déchlorane. En production depuis le début des années 1970, la première détection du DP a été faite en 2006 à la suite de l'analyse chimique des carottes sédimentaires dans la région des Grands Lacs (Hoh *et al.*, 2006). Les recherches ont également révélé que le DP a une distribution à grande échelle au niveau de la planète, puisque nous le retrouvons dans l'atmosphère et dans l'eau salée de l'Arctique jusqu'en Antarctique (Möller *et al.*, 2010). Depuis, la détection du DP chez les poissons (Houde *et al.*, 2014; Tomy *et al.*, 2008) et les bivalves, tant d'eaux salées (Jia *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2015) que d'eaux douces (Tomy, *et al.*, 2007; Iqbal *et al.*, 2017) est fréquente. Pourtant, peu de recherche sur la toxicité du DP a été faite depuis sa détection au milieu des années 2000 chez les espèces marines. Cela nécessite donc des recherches écotoxicologiques afin de remplir les informations manquantes sur sa toxicité.

Des études récentes démontrent la génotoxicité du DP (i.e., les dommages liés à l'ADN) et la production d'un stress oxydant chez une bactérie luminescente (*Tetrahymena thermophila*) (Dou *et al.*, 2015) et chez la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*) (Barón *et al.*, 2016) au-delà des concentrations environnementales observées jusqu'à maintenant. En effet, les concentrations les plus élevées mesurées dans les écosystèmes aquatiques (i.e., les régions côtières du nord de la Chine et les eaux brutes de la centrale d'eaux usées de Shanghai) se situent entre 1,4 et 1,8 ng de DP/L, respectivement (Jia *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2014).

Ce projet a pour objectif général de déterminer quelques indicateurs d'effets dans des conditions *in vivo* et *in vitro*, afin de comprendre la toxicité du DP à des concentrations environnementales sur la moule bleue. Ces indicateurs d'effets se regroupent en quatre groupes: l'intégrité physiologique (histopathologies), le système immunitaire, le système reproducteur et le stress oxydant. Étant donné que les bivalves ont la capacité de bioaccumuler des composés organiques comme le DP et que ces espèces marines répondent efficacement au niveau biologique (i.e., présence

d'histopathologies au niveau de la glande digestive et dommages à l'ADN dans les hémocytes de l'hémolymph) suite à l'exposition d'un polluant (Rittschof et McClellan-Green, 2005; Brooks *et al.*, 2009), la moule bleue (*Mytilus edulis*) a donc été retenue. Nous retrouvons cette espèce marine en Arctique jusqu'en Antarctique et sa distribution est contrôlée par rapport à plusieurs facteurs environnementaux, dont: la température, la salinité, la lumière, la nourriture et la présence de contaminants (Seed, 2009).

CHAPITRE I

1.1 Revue de littérature

1.1.1 Généralités

L'omniprésence de produits de consommation à base de pétrole a nécessité de limiter leur inflammabilité, ce qui est devenu un enjeu de taille pour l'industrie chimique. En effet, celle-ci a mis sur le marché une myriade de composés chimiques ignifuges afin de respecter le critère d'inflammabilité prescrit par un certain cadre normatif. Ainsi, nous retrouvons ces composés chimiques nommés retardateurs de flamme (RF) dans une pléthore de matériaux: les plastiques, le bois et les textiles. Il existe quatre grands groupes de RF: 1) les composés inorganiques, 2) les composés organiques halogénés, 3) les composés organiques organophosphorés et 4) les composés à base azotée (Alaee *et al.*, 2003).

Ce qui caractérise la plupart des composés organiques halogénés est leur persistance dans l'environnement (Qiu *et al.*, 2007; He *et al.*, 2014) et leur accumulation dans la chaîne trophique (Klausterhaus *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2010). Plusieurs de ces RF sont maintenant identifiés comme étant des polluants organiques persistants (POPs) par la Convention de Stockholm. En conséquence, ces contaminants ont progressivement été retirés du marché, particulièrement la plupart des congénères des polybromodiphényles éthers (PBDE) issus de mélanges techniques, i.e. l'octa- et penta-BDE (UNEP, 2013). Suite au remplacement progressif d'un autre mélange technique du PBDE (i.e., le Deca-BDE) maintenant reconnu pour sa persistance et sa toxicité dans l'environnement, tant en Europe qu'en Amérique du Nord, l'industrie chimique utilise davantage des produits de remplacement (Bergman *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). Ces RF, dits émergents (y compris plusieurs composés organiques

polychlorés), ont conséquemment été mis sur le marché, comme le Déchlorane Plus (DP) (EPA, 2014; Sun *et al.*, 2016).

1.1.2 Déchlorane Plus

Le DP est un retardateur de flamme polychloré que l'on retrouve dans les matériaux à base de polymère, comme dans l'enrobage de fils électriques, les connecteurs d'ordinateur et les matériaux de toiture (He *et al.*, 2014). Sa fabrication a commencé il y a près de 40 ans, plus particulièrement comme produit de remplacement au mirex ou Déchlorane, insecticide et retardateur de flamme banni depuis 1978 (Kaiser, 1978; IPSC, 1984). Il fait également partie de la liste des 12 premiers POPs de la Convention de Stockholm (UNEP, 2004). La consommation non-agricole du Déchlorane a nécessité la fabrication d'autres composés chimiques similaires suite à son élimination sur le marché des produits de consommation. Une pléthore de molécules de la famille des déchloranes a donc vu le jour, dont: le Déchlorane 602 (Dec 602), le Déchlorane 603 (Dec 603), le Déchlorane 604 (Dec 604) et le Déchlorane plus (DP) (mélange commercial de deux isomères dans une proportion 1:3, i.e. *syn*-DP et *anti*-DP, respectivement) (figure 1.1).

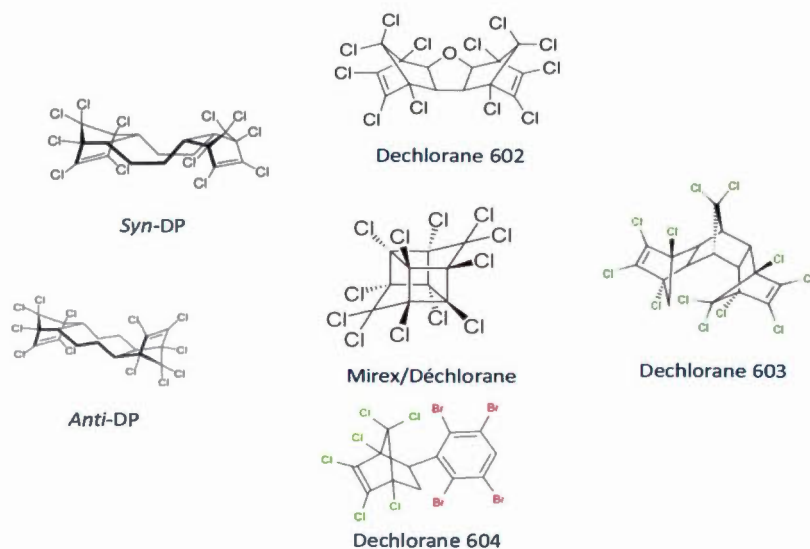


Figure 1. 1: Composés organiques polychlorés de la famille des déchloranes (tiré de Feo *et al.*, 2012)

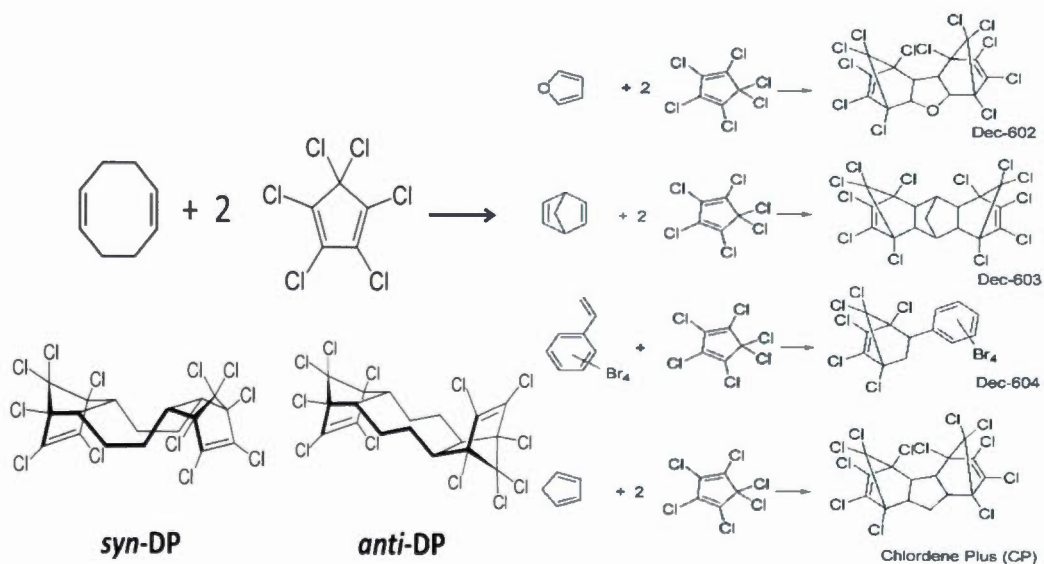


Figure 1. 2: Réaction chimique de Diels-Alder pour former le caractère stéréoisomérique du DP (à gauche) et d'autres composés de la famille des déchloranes (à droite) (tiré de Sverko *et al.*, 2011)

Le DP reproduit un type de liaison chimique similaire à celui d'autres RF halogénés (e.g., les PBDEs), c'est-à-dire que ces composés ajoutés à la matrice n'ont pas de liens covalents avec celle-ci (Siddiqi *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2015). Ainsi, ils ont tendance à se diffuser hors des produits de consommation, durant leur cycle de vie ou d'usure, et à se retrouver dans l'environnement. Les produits commerciaux de la famille des déchloranes proviennent de la réaction de Diels-Alder: un alcène (diénophile) s'additionne à un diène conjugué pour former un dérivé de cyclohexène (i.e., hexachlorocyclopentadiène) (figure 1.2). Ainsi, les propriétés physico-chimiques propres à la famille des déchloranes sont similaires (Shen *et al.*, 2010). De plus, étant donné la similarité de la réaction chimique, ces composés (et d'autres molécules similaires) (figure 1.3) peuvent également être classés comme impuretés tant dans les RF (i.e., la famille des déchloranes) que dans certains pesticides polychlorés (i.e., le chlordane). Leurs présences ont été détectées dans l'environnement, plus particulièrement dans les sédiments de la région des Grands Lacs (Sverko *et al.*, 2011; Sverko *et al.*, 2010). Le DP a été détecté pour la première fois dans l'environnement biotique (doré jaune) et abiotique (air et sédiment) dans la région des Grands Lacs (Hoh *et al.*, 2006). Depuis, le DP a été détecté un peu partout dans les réservoirs biogéochimiques de la planète (Wang *et al.*, 2016) (figure 1.4). Certaines études ont démontré que le DP est présent dans les poussières de l'air que l'on retrouve dans les milieux domestiques dans la région de Vancouver (Shoeib *et al.*, 2012) et d'Ottawa au Canada (Zhu *et al.*, 2007) ainsi que la province de Guangdong dans le sud de la Chine (Wang *et al.*, 2011). Le lien entre les activités anthropiques et la présence du DP dans l'environnement est donc un facteur déterminant (Sun *et al.*, 2013). On retrouve également le DP dans l'atmosphère (Liu *et al.*, 2016) et les milieux aquatiques tant en eaux salines (mer de Bohai en Chine; i.e., la valeur moyenne de DP se situe à 1,8 ng/L) (Jia *et al.*, 2011) que dans l'affluent des eaux usées municipales dans la ville de Shanghai en Chine (valeur maximale de DP à 1,4 ng/L) (Xiang *et al.*, 2014). La chaîne trophique des milieux aquatiques ne semble pas épargnée, puisqu'elle est également le théâtre de l'accumulation du DP, tant dans le

Grand Canal de Beijing-Hangzhou, à proximité de la province de Jiangsu en Chine (Wang *et al.*, 2015), que dans les lacs Winnipeg et Ontario situés au nord de la ville de Winnipeg au Manitoba et la région des Grands lacs, respectivement (Tomy *et al.*, 2007). Cela reflète en partie les propriétés physico-chimiques du DP (e.g., son caractère hydrophobe représenté par un $\text{Log } K_{\text{OW}} > 7$) (tableau 1.1). Le DP est donc persistant et semble se transporter sur de longues distances à travers la planète (Möller *et al.*, 2010).

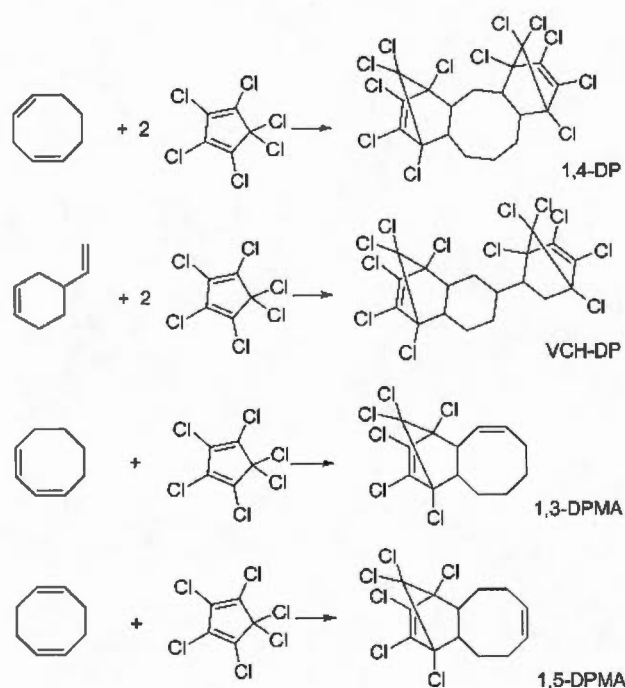


Figure 1. 3: Molécules provenant de la dégradation ou d'impuretés du DP (tiré de Sverko *et al.*, 2011)

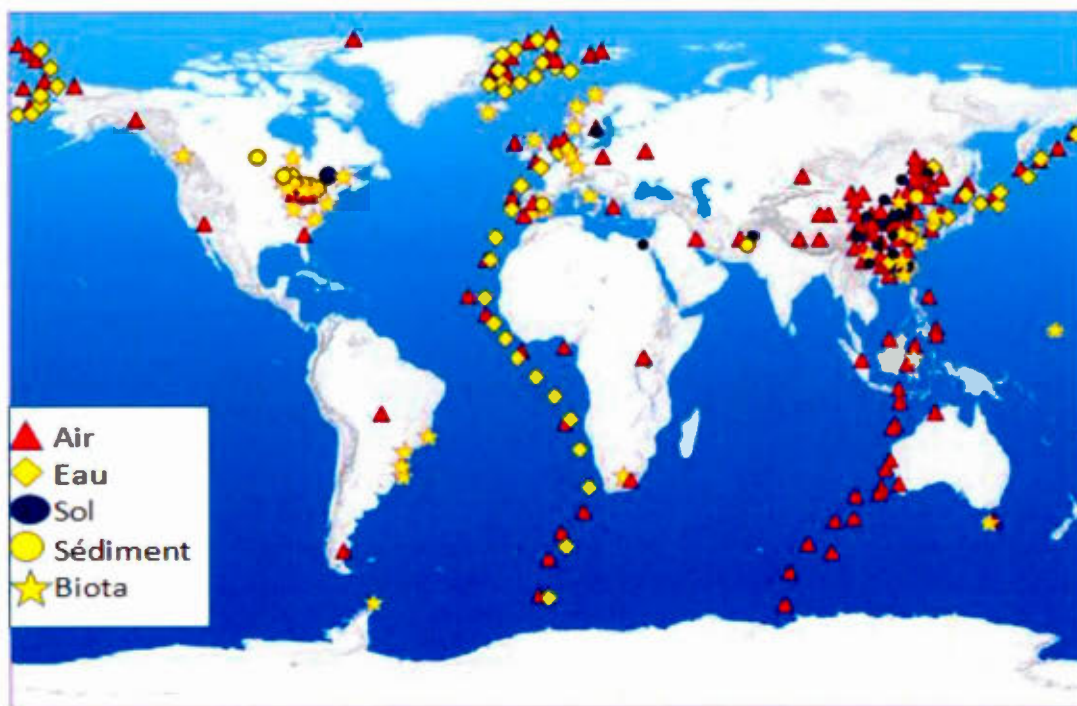


Figure 1.4: Distribution du DP telle que détectée dans les réservoirs biogéochimiques de la planète (tiré de Wang *et al.*, 2016)

Étant donné que le DP est considéré comme un produit de remplacement au déca-BDE (EPA, 2014; Sun *et al.*, 2016) et en raison du peu d'informations sur la toxicité du DP, la nécessité d'entreprendre des recherches en ce sens est donc importante (Vorkamp *et al.*, 2015). Le caractère stéréoisomérique du mélange commercial du DP provoque des comportements d'accumulation différents tant pour l'isomère *syn*- que pour l'isomère *anti*- une fois dans l'environnement. En effet, Tomy *et al.* (2007) ont observé une plus grande bioaccumulation de l'isomère *syn*- par rapport à l'isomère *anti*- pour quelques espèces de poisson du lac Winnipeg (e.g., le meunier noir et le grand corégone) et vice versa (e.g., le doré jaune et le laquaiche aux yeux d'or). De plus, le portrait d'accumulation stéréoisomérique du DP dans l'environnement peut également être étudié grâce au ratio de la fonction de l'isomère *anti*- (valeur de la concentration de l'isomère *anti*- divisé par la somme de la concentration des deux

isomères), ce qui confirme le caractère spécifique de l'accumulation du DP chez les espèces aquatiques, e.g., le grand corégone ($f_{\text{anti}} = 0.445$) et le doré ($f_{\text{anti}} = 0.961$) (Tomy *et al.*, 2007).

Peu d'études ont été effectuées quant à la toxicité du DP. Deux études ont démontré la génotoxicité du DP suite à des expositions *in vivo* d'une bactérie luminescente (*Tetrahymena thermophila*) et la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*) à des doses de l'ordre de 300 à 1500 µg de DP/L (Dou *et al.*, 2015) et de 5,6 à 100 µg de DP/L (Barón *et al.*, 2016), respectivement.

Tableau 1. 1: Propriétés physico-chimiques du DP (tiré de Feo *et al.*, 2012; Xian *et al.*, 2011)

Propriétés physico-chimiques	Déchlorane plus (DP)
Structure chimique	$C_{18}H_{22}Cl_{12}$
Pression de vapeur (Pa)	$4,71 \times 10^{-8}$
Densité (g/cm ³)	1,8
Solubilité dans l'eau (µg/L)	0,044 - 249
Log K _{OW} (coefficient de partition octanol-eau à 25 °C)	9,3

1.1.3 Modèle d'étude: la moule bleue

Selon Seed (2009), la distribution géographique des espèces aquatiques est contrôlée en grande partie par la température de l'eau. Les microphages, comme les bivalves, sont des espèces filtreurs qui possèdent une vaste distribution qui s'étend jusqu'aux deux hémisphères de la planète, de l'océan Arctique et ses tributaires jusqu'en

Californie, tant dans les eaux marines que dans les eaux douces. La capacité des bivalves à absorber des contaminants, plus particulièrement les RF halogénés, a été observée un peu partout sur la planète, dont les régions côtières au nord de l'Espagne (Villaverde-de-Sáa *et al.*, 2013) et en aval du canal de rejet des effluents d'une usine de traitement des eaux usées dans la rivière Yadkin en Caroline du nord (La Guardia *et al.*, 2012). Les moules du genre *mytilus* dont la moule bleue fait partie, sont omniprésents dans les eaux marines (Gaitán-Espita *et al.*, 2016) (figure 1.5). Plusieurs biomarqueurs ont été développés chez les bivalves pour évaluer la toxicité d'une grande variété de xénobiotiques, e.g., hydrocarbures aromatiques polycyclique (HAP) et tributylétain (TBT) (Brooks *et al.*, 2009; Hagger *et al.*, 2005), ce qui fait de ces espèces des indicateurs de pollution de grand intérêt écotoxicologique (Rittschof et McClellan-Green, 2005). Ces biomarqueurs se regroupent en trois classes: physiologiques (i.e., histopathologies), cellulaires (dommages à l'ADN, phagocytoses et viabilité) et moléculaires (i.e., COX et peroxydation des lipides). L'utilisation de la moule bleue et des outils disponibles peuvent donc nous donner de l'information au niveau des effets de l'exposition au DP sur l'intégrité des tissus, la production de stress oxydant, la reprotoxicité, la génotoxicité et l'immunotoxicité.

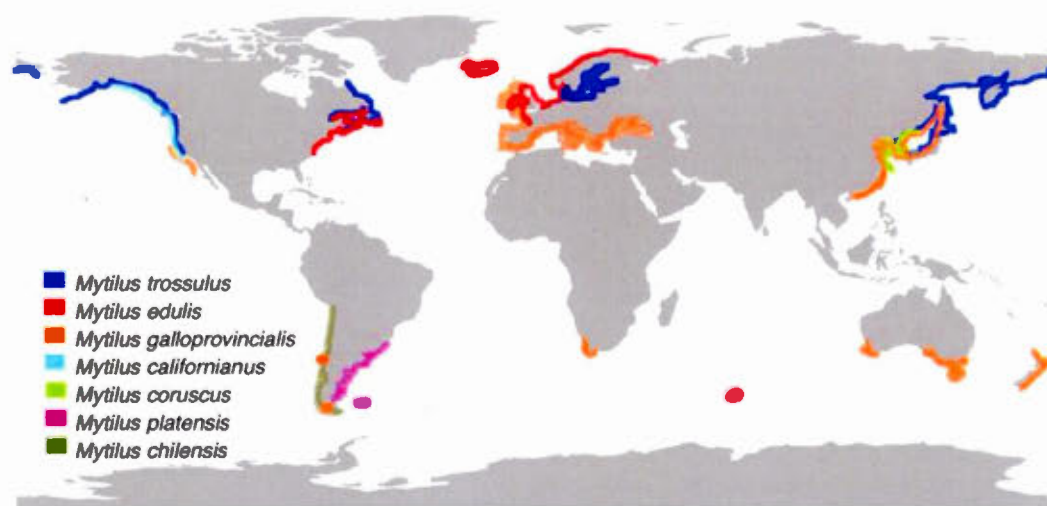


Figure 1. 5: Distribution géographique des moules marines du genre *mytilus*, selon les études écologiques (tiré de Gaitan-Espita *et al.*, 2016. doi: 10.1038/srep26853)

1.1.4 Biomarqueurs d'intérêt

Après une exposition à des xénobiotiques, les tissus des moules peuvent subir des altérations observables par des analyses histopathologiques ou de la présence de microlésions au niveau des tissus, particulièrement dans la glande digestive (voir figure 1.6). Cuevas *et al.* (2015) ont observé des nécroses et des fibroses au niveau des glandes digestives et des gonades sur des échantillons de moules récoltées sur 5 sites contaminés par des composés inorganiques (e.g., cadmium, mercure, plomb) et des composés organiques (polychlorobiphényles et les composés organiques polycycliques). Li *et al.* (2011) ont relevé une inhibition de la spermatogenèse et une réduction de spermatocytes dans l'analyse histopathologique des gonades chez les mâles d'une espèce endémique de méné de la région de Jiuxiang dans la province de Sichuan en Chine, suite à l'exposition *in vivo* pendant 21 jours d'un congénère du PBDE (i.e., BDE-209) à une concentration de 10 µg/L.

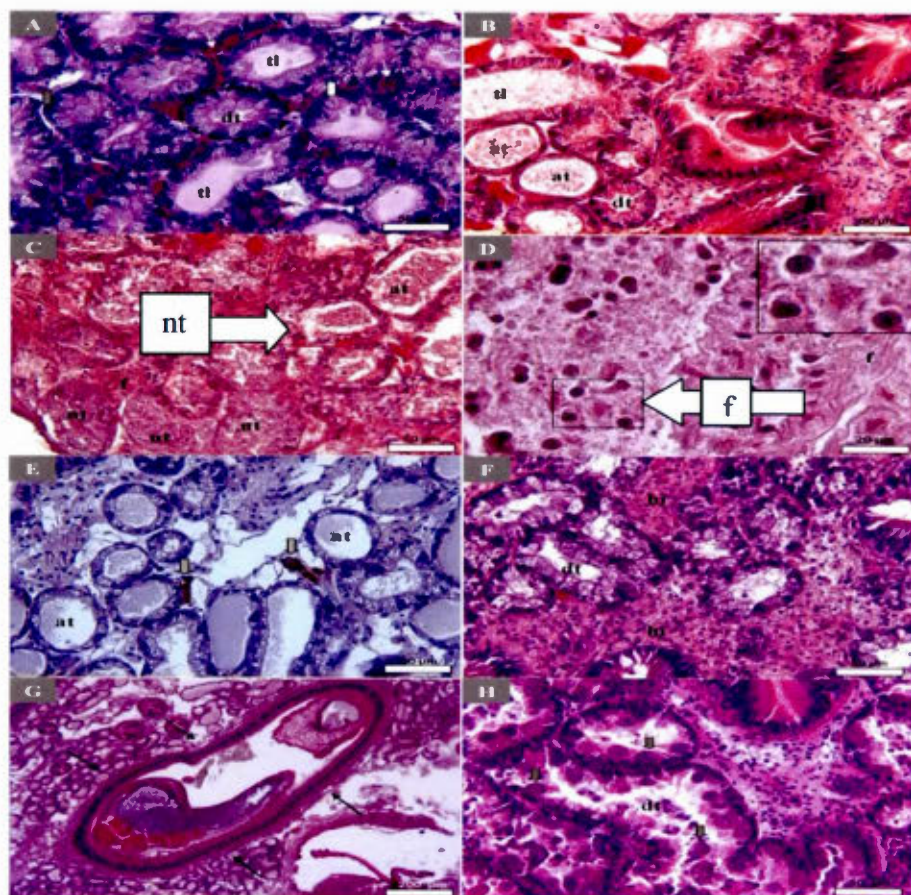


Figure 1. 6: Histopathologies examinées sur la glande digestive d'une moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*) (note: f: fibrose; nt: nécrose) (Tiré de Cuevas et al., 2015)

Une fois dans l'organisme, les xénobiotiques peuvent aussi provoquer plusieurs réactions biologiques, dont la phagocytose, une réponse immunitaire non-spécifique (Rawley et Powell, 2007). Celle-ci représente une des premières barrières au niveau cellulaire pour combattre les contaminants, particulièrement chez les invertébrés comme les moules d'eau salée (e.g., la moule bleue) et d'eau douce (e.g., *elliptio complanata*) (Bruneau et al., 2013). La phagocytose est un procédé immunologique similaire chez les vertébrés et les invertébrés impliquant plusieurs étapes telles que: la reconnaissance, le chimiotactisme, l'adhésion de la cellule phagocytaire au

contaminant, l'ingestion et la destruction (Galloway et Depledge, 2001). Peu d'informations existent sur les effets du DP ou d'autres composés de la famille des déchloranes sur le système immunitaire. Liu *et al.* (2009) a constaté une diminution significative de l'activité phagocytaire chez un pétoncle d'eau marine (i.e., *Chlamys farreri*) pour toutes les doses utilisées (i.e., 0.05, 0.5, 5.0 et 50 µg/L) lors d'une exposition *in vivo* de 1 à 30 jours d'un mélange commercial de polychlorobiphényles (i.e., Aroclor 1254). L'étude de Grabowski (1981) sur le mirex a observé d'autres effets immunotoxiques chez le rat après une exposition prénatale de 7 jours, plus particulièrement la formation d'œdème (inflammation) au niveau du fœtus. La formation des œdèmes est possible lors d'une hausse de la perméabilité des vaisseaux sanguins, provoquant une réponse immunotoxique (Mitchell, 2005). Lv (2015) a également observé une réponse immunotoxique, l'apoptose, et la formation de dérivés réactif de l'oxygène (ROS), dans les macrophages de souris exposées de 2 à 24 heures au BDE-47 et au BDE-209.

La peroxydation des lipides est générée par un stress oxydant à la suite d'un déséquilibre entre la formation d'espèces chimiques oxygénées (i.e., ROS) et la production déficitaire d'antioxydants (e.g., la superoxyde dismutase et le glutathion), ce qui altère l'intégrité cellulaire comme la membrane phospholipidique. Ceci a été observée (Gagné *et al.*, 2011) chez des moules d'eau douce exposées *in situ* aux eaux usées de deux usines d'épuration situées au nord de la ville de Laval dans la rivière des Mille-Îles. Hu *et al.* (2015) ont enregistré une hausse de la peroxydation des lipides chez un bivalve d'eau marine (*Chlamys farreri*) suite à l'exposition *in vivo* de 1 à 10 jours d'un RF polybromé (i.e., tetrabromobisphénol A ou TBBPA). Cela a provoqué une suite de réactions sur d'autres biomolécules qui ont une filiation par rapport au stress oxydant, comme le glutathion-s-transférase, le superoxyde dismutase et quelques enzymes liés au cytochrome P450 (e.g., Cytochrome b5). La peroxydation des membranes phospholipidiques, provoquant la perte de perméabilité cellulaire, permet l'atteinte possible à l'intégrité de l'ADN (Valavanidis *et al.*, 2006).

Dou *et al.* (2015) ont entrepris l'étude de la génotoxicité sur des bactéries luminescentes (*Vicia faba* et *Tetrahymena thermophila*) suite à l'exposition *in vitro* de 30 minutes à des concentrations de DP qui se situent entre 2 et 1500 µg/L. Cela a eu des effets délétères, plus particulièrement sur la réponse non-spécifique que sont les dommages liés à l'ADN (Shugart, 2000), provoquant des modifications structurelles cellulaires (i.e., formation de micronucléus) chez une seule bactérie luminescente (i.e., *T. thermophila*). Barón *et al.* (2016) ont également observé des dommages liés à l'ADN (5.6, 56 et 100 µg/L) et la formation de micronucléus (100 µg/L) sur la moule méditerranéenne lorsqu'exposée *in vivo* au DP pendant 6 jours.

D'autres biomolécules peuvent être affectées par la peroxydation lipidique, comme l'isoenzyme COX-2 (cyclooxygénase-2) impliqué dans la réponse inflammatoire et le cycle de reproduction chez les vertébrés (i.e., les souris) (Smith et Langenbach, 2001). Une étude récente (Woo *et al.*, 2013) a permis d'observer une production de la peroxydation des lipides grâce à une diminution de l'expression génétique de l'isoenzyme COX-1 (qui est un acteur déterminant dans l'intégrité cellulaire), altérant certaines fonctions immunitaires suite à l'exposition *in vivo* à des conditions d'hypoxie (i.e., concentration d'oxygène dissous égale à 2 ppm) pendant 24, 48 et 72 heures chez la moule méditerranéenne (*Mytilus galloprovincialis*). De plus, la COX est l'enzyme responsable dans la biotransformation de l'acide arachidonique en prostaglandine qui module l'effet de la sérotonine dans la production des œufs chez les bivalves, tel qu'observé chez le pétoncle japonais (*Patinopecten yessoensis*) (Matsutani et Nomura, 1987). La production de la COX peut donc influencer la production de prostaglandines et, ainsi, moduler les effets de la sérotonine sur la reproduction chez les invertébrés (e.g., les bivalves), tant au niveau des gonades que dans les branchies, comme cela a été observé durant trois stades de la période de frayère (production des œufs), i.e., immédiatement après la production des œufs (temps 0), 12 à 24 heures suivant la production des œufs et 7 à 35 jours après la

période de frayère, chez le pétoncle chilien (*Argopecten purpuratus*) (Martínez et Rivera, 1994).

1.2 Objectifs et hypothèses

L'omniprésence du DP dans les réservoirs biogéochimiques de la planète, son utilisation croissante comme retardateur de flamme alternatif et le manque d'informations sur les effets liés à l'exposition du DP sur les organismes aquatiques nécessitent des recherches toxicologiques qui permettront d'obtenir une meilleure compréhension des effets du DP au niveau physiologique, cellulaire et moléculaire. Ainsi, l'objectif principal de ce projet est d'évaluer, dans une démarche expérimentale, **le portrait d'accumulation stéréoisomérique du DP et d'identifier des bioindicateurs d'effets** (e.g., les biomarqueurs) suite à l'exposition au DP chez un bivalve d'eau marine, la moule bleue (*Mytilus edulis*).

1.2.1 Objectif spécifique

1. Plus précisément, l'objectif est d'évaluer les effets toxicologiques du DP au niveau de l'intégrité physiologique des tissus (i.e., histopathologies), la phagocytose, la viabilité cellulaire, la peroxydation des lipides, l'intégrité du matériel génétique ou la rupture de brins d'ADN, et l'activité de la cyclooxygénase chez la moule bleue, suite à des expositions *in vivo* et *in vitro* au DP. Ces biomarqueurs ont été sélectionnés étant donné leurs recours fréquents dans les études écotoxicologiques antérieures chez les organismes aquatiques. Ainsi, la 1) phagocytose et la viabilité cellulaire, 2) l'activité de la cyclooxygénase, et 3) la peroxydation des lipides et la rupture de brins d'ADN permettent d'étudier les effets du DP sur le système immunitaire et reproducteur, et le stress oxydant, respectivement.

1.2.2 Hypothèses

1. Le portrait d'accumulation du DP reflète son caractère stéréoisomérique (i.e., *syn*- et *anti*-) et les concentrations des deux isomères augmentent en fonction de la dose dans la glande digestive et les muscles de la moule bleue suite à une exposition *in vivo* de 29 jours.

Considérant que les études écotoxicologiques ont observé un mode d'accumulation interspécifique des isomères du DP chez plusieurs espèces aquatiques, dont les bivalves (Tomy *et al.*, 2007); considérant que cette accumulation stéréoisomérique est différente selon les tissus analysés (Zhang *et al.*, 2011) et considérant que ce schéma d'accumulation des isomères du DP est modifié par rapport à la métabolisation du DP une fois dans l'organisme (Sverko *et al.*, 2011). Le portrait d'accumulation sera spécifique à l'espèce marine à l'étude.

2. L'observation d'effets liés à l'intégrité des tissus (histopathologies), l'immunotoxicité (viabilité cellulaire et phagocytose), la reprotoxicité (l'activité de la cyclooxygénase) et le stress oxydant (peroxydation des lipides et rupture des brins d'ADN) en fonction de la dose suite à l'exposition du DP chez la moule bleue.

Considérant que les études toxicologiques sur l'exposition du DP ont permis d'observer jusqu'à maintenant des effets génotoxiques chez une bactérie luminescente (Dou *et al.*, 2015) et sur la moule méditerranéenne (Bàron *et al.*, 2016), plus particulièrement au niveau de ruptures des brins d'ADN, ces effets toxicologiques seront donc observés. Par contre, pour ce qui est des autres biomarqueurs à l'étude (i.e., histopathologies, peroxydation des lipides, l'activité de la cyclooxygénase, la viabilité cellulaire et la phagocytose), les résultats obtenus sur l'exposition du DP chez un bivalve d'eau marine pour cette étude est sans précédent.

CHAPITRE II

DECHLORANE PLUS INDUCES OXIDATIVE STRESS AND DECREASES CYCLOOXYGENASE ACTIVITY IN THE BLUE MUSSEL

Pierre-Luc Gagné^{a, b}, Marlène Fortier^c, Marc Fraser^{b, c}, Lise Parent^{b, d}, Cathy Vaillancourt^{b, c} and Jonathan Verreault^{a, b, *}

^a Centre de recherche en toxicologie de l'environnement (TOXEN), Département des sciences biologiques, ^bCentre de recherche interdisciplinaire sur le bien-être, la santé, la société et l'environnement (CINBIOSE), Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Canada H3C 3P8.

^c INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531, boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7.

^d Département Science et technologie, Télé-université (TÉLUQ), 5800, rue Saint-Denis, bureau 1105, Montréal, Québec, Canada H2S 3L5

ABSTRACT

Dechlorane Plus (DP) is a chlorinated flame retardant used mainly in electrical wire and cable coating, computer connectors and plastic roofing materials. Concentrations of DP (*syn* and *anti* isomers) are increasingly being reported in aquatic ecosystems worldwide. However, there is exceedingly little information on the exposure-related toxicity of DP in aquatic organisms, especially in bivalves. The objective of this study was to investigate the *in vivo* and *in vitro* effects of DP on histopathology, lipid peroxidation (LPO) levels, cyclooxygenase (COX) activity, phagocytosis capacity and efficiency, and DNA strand breakage on the blue mussel (*Mytilus edulis*) following a 29 d exposure (0.001, 0.01, 0.1 and 1.0 µg DP/L). Blue mussels accumulated DP in muscles and digestive glands in a dose-dependent manner. LPO levels in gills were found to increase by 82% and 67% at the 0.01 and 0.1 µg DP/L doses, respectively, while COX activity in gills decreased by 44% at the 1 µg DP/L dose. No histopathological lesion in gonads was found following DP exposure. Moreover, no change in hemocyte DNA strand breakage, phagocytosis rate, and viability was observed following DP exposure. Present study showed that toxicity of DP may occur principally via oxidative stress in the blue mussel and potentially other bivalves, and that gills represent the most responsive tissue to this exposure.

Keywords: Dechlorane Plus; flame retardant; blue mussel; cyclooxygenase; lipid peroxidation; DNA damage.

2.1 Introduction

Dechlorane Plus (DP) is a highly chlorinated compound that has been manufactured over the last 40 years as a replacement to Dechlorane (Mirex) (Fang et al., 2014) and is mainly used today as flame retardant (Wang et al., 2016). DP is synthesized by a Diels-Alder reaction of hexachlorocyclopentadiene and cyclooctadiene (Shen et al., 2011). The DP technical mixture contains two stereoisomers (*syn*- and *anti*-DP) in a ratio of approximately 1:3 (Wu et al., 2010). Usage of DP includes electrical wire and cable coating, computer connectors, plastic roofing materials and other polymeric materials (Feo et al., 2012). DP is currently unregulated and considered as a high production-volume chemical in the USA with an annual production or importation estimated to 500 t (EPA, 2015). Studies have also reported the presence of DP as an impurity in other chlorinated compound mixtures including the pesticide Chlordane (Shen et al., 2011; Sverko et al., 2010). The environmental persistence, bioaccumulation propensity and potential for toxicity suggest that DP may represent a persistent organic pollutant (POPs) candidate (Feo et al., 2012).

The global bans of Octa- and Penta-bromodiphenyl ether (BDE) technical mixtures (UN, 2009) have resulted in an increased market demand for alternative flame retardants (Bergman et al., 2012; Chen et al., 2013). DP has been identified as a possible replacement product to the recently phased-out Deca-BDE in North America and Europe (EPA, 2014), and was proposed for listing in the Stockholm Convention on POPs (UN, 2015).

DP has been reported in wastewater from Shanghai and water samples from the coastal shore of northern China at concentrations up to 1.4 and 1.8 ng/L, respectively (Xiang et al., 2014; Jia et al., 2011). DP has also been determined in sediments of tributaries of the Laurentian Great Lakes (Shen et al., 2011) and several studies have reported levels of DP in aquatic species, including certain marine bivalves (Asiatic hard clams (*Meretrix meretrix* L) and Manila clams (*Ruditapes philippinarum*)) from the Pearl River estuary in China in which high levels (13-37 ng/g lw) were found

(Sun et al., 2015). DP was also determined at lower levels in several marine mollusks from the Northern coast of Spain, e.g., Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*), manila clams and cockles (*Cerastoderma edule*) (Villaverde-de-Sáa et al., 2013). Recent studies have shown that DP is genotoxic to luminous bacteria (*Tetrahymena thermophila*) (Dou et al., 2015), earthworms (*Eisenia fetida*) (Yang et al., 2016) and Mediterranean mussel (Barón et al., 2016). There are, however, limited information available on the bioaccumulation dynamics and toxicity (i.e., reprotoxicity and immunotoxicity) of DP in bivalves, and there is an urgent need to fulfill these knowledge gaps.

The blue mussel (*Mytilus edulis*) is ubiquitously distributed in the marine environment from Antarctica up to Arctic regions. Its distribution, reproductive cycle and growth are influenced by an array of environmental factors including temperature, salinity, light, and food supply (Seed, 2009). Their sedentary lifestyle makes blue mussels ideal candidates for xenobiotic bioaccumulation and toxicity studies. Mussels are well-known to respond to a wide array of pollutants including municipal wastewater effluent that was shown to induce lipid peroxidation (LPO) in mussel gonads (Gagné et al., 2011a; Gagné et al., 2011b) as well as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for which exposure was associated with DNA damage in mussel hemocytes and microlesions in digestive glands (Brooks et al., 2009).

The first line of defence to xenobiotics in mussels is phagocytosis by the hemocytes as for example demonstrated in marine (*Mya arenaria*) and freshwater bivalves (*Elliptio complanata*) exposed to municipal wastewater effluent (Blaise et al., 2002). However, there are to our knowledge exceedingly limited information on the immunotoxicity of DP in aquatic organisms. Nevertheless, bivalves were shown to exhibit inhibition (Pichaud et al., 2008) or stimulation (Croxtton et al., 2012) of phagocytosis by hemocytes following exposure to PAHs. In mice, exposure to the PBDE congeners BDE-47 (one major congener in Penta-BDE) and BDE-209 (>97%

of Deca-BDE) was shown to induce immunosuppressive response through formation of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in peritoneal macrophages of female following a 24 h exposure (Lv et al., 2015). Depressed immunity in bivalves may thus lead to susceptible disease vulnerability, i.e., to marine pathogens *Listonella anguillarum*, as demonstrated in salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed *in vivo* for 40 d to five PBDE congeners (i.e., BDE-47, -99, -100, -153, and -154) (Arkoosh et al., 2010).

DP exposure was also shown to induce a genotoxic response (i.e., DNA strand breakage) in Mediterranean mussels at concentrations far greater than those found in aquatic ecosystems in general (>1.8 ng/L) (Barón et al., 2016). Interaction with genetic material can also be associated with enhanced oxidative stress (i.e., increased LPO levels) by altering the permeability of cell membrane (Sheehan and McDonagh, 2008). For example, recent study on the molecular properties of the anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-hypertensive of ethyl acetate-methanol extracts in marine bivalves (i.e., *Villorita cyprinoides* and *Paphia malabarica*) showed significant decrease of cyclooxygenase (COX) activity that was indirectly related to oxidative stress (Joy et al., 2016). Also, Gagné et al. (2011b) showed significant increase of COX activity and LPO levels in gonads of a freshwater bivalve (*Elliptio complanata*) following exposure to municipal wastewater effluent. Given the key role of COX on the immune system (Shimokawa and Smith, 1992; Gagné et al., 2007) and spawning (Matsutani and Nomura, 1994) in invertebrates including bivalves, it is of primary importance to determine the effects of DP on this enzyme.

Due to the ubiquitous environmental presence and potentially growing usage of DP as an alternative flame retardant, and considering the lack of information on the exposure-related effects of DP on aquatic organisms, the objective of the present study was to investigate the accumulation and *in vivo* and *in vitro* effects of chronic

DP exposure on the DNA and tissue integrity, immune system, oxidative stress and the reproductive system of blue mussels.

2.2 Materials and methods

2.2.1 *In vivo* exposure

Adult blue mussels (shell length: 62.9 ± 1.7 mm; $n = 72$) were obtained from the mussel husbandry *La moule du large* (Havre-aux-Maisons, QC, Canada). Upon reception, mussels were acclimatized for 14 d in 20 L tanks filled with artificial aerated marine water (AAMW) at a salinity of 31 psu (Instant Ocean, Reef Crystal, Cincinnati, OH, USA) that was changed twice a week. After the acclimatization period, mussels were divided into six groups ($n = 12$ per group) in 3 L Pyrex beakers: a control (AAMW only), a vehicle control (AAMW with DMSO; 0.002% v/v) and four doses of DP (stock solution: 50 mg/L; Wellington laboratories, Guelph, ON, Canada): 0.001, 0.01, 0.1 and 1.0 $\mu\text{g/L}$. The selected DP doses represented two environmental concentrations (0.001 and 0.01 $\mu\text{g/L}$) (wastewater from Shanghai and seawater of coastal shore in Northern China: Xiang et al., 2014; Jia et al., 2011) and 10- and 100- fold higher concentrations. Mussels were kept at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under a photoperiod of 12h light and 12h dark. The mussels were fed during the acclimatization period with commercially available algae (i.e., phytoplankton solution (Phytoplex) containing *Nannochloropsis*, *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis sp.* in a concentration of 3.0×10^9 cells/5 mL) (Reef solution, Laval, QC, Canada), although they were not fed during the exposure period that lasted 29 d. During this exposure period, 14 individuals were found dead although this mortality was independent to the DP dose. After the exposure period, mussels (final $n = 58$) were weighed and measured individually, and hemolymph was collected from the posterior adductor muscle using a 3 mL syringe with a 23 G needle. Gills, muscles, digestive glands and mantles were then collected for subsequent analysis. More specifically, digestive glands and muscle tissues were homogenized using a tissue grinder in a buffer

consisting of 100 mM NaCl and Hepes-NaOH, pH 7.4, 0.1 dithiothreitol and 1 µg/mL aprotinin, pooled and kept at -20 °C until chemical analysis (section 2.3). Gills were kept in the same buffer at -80 °C until LPO and COX analysis (sections 2.2.5.3 and 2.2.5.4). A section of the mantle was also excised and fixed in Bouin's solution for 24 h at room temperature to determine the reproductive cycle stage (section 2.2.2).

2.2.2 Reproductive stage and gonadal integrity

Gonadal reproductive stage of blue mussels was determined following Ruiz et al. (2011) and Ananthraman and Craft (2012). Histopathological lesions were examined according to description by Cuevas et al. (2015). Briefly, after being fixed in Bouin's solution, individual gonad tissue samples were embedded in paraffin using a dehydration protocol (several cycles of ethanol and xylene). The paraffin blocks were sliced at 5 µm and mounted on microscope slides. After drying, slides were soaked using several cycles of alcohol and solvent (citrisolv) for deparaffinization. The embedded gonad tissues were then hydrated with hematoxylin and eosin Y. Each slide was examined with a light microscope (200X).

2.2.3 DP analysis

The homogenate pool samples including digestive glands and muscles of blue mussels were analyzed for DP (*syn*- and *anti*-DP) following methods described by Houde et al. (2014). Briefly, aliquots of homogenate pool samples (0.75-1.0 g) were ground with diatomaceous earth, spiked with 100 µL of the internal standard ¹³C-*syn*-DP (200 ppb) and extracted with dichloromethane:*n*-hexane (50:50, v:v) using a pressurized liquid extraction system (Fluid Management Systems, Watertown, MA, USA). The lipid content was determined gravimetrically. Sample clean-up was further achieved using a PBDE-free acid-basic-neutral silica column followed by a PBDE-free neutral alumina column (Fluid Management Systems) eluted with dichloromethane:*n*-hexane (50:50, v:v). Identification and quantification of DP

isomers were performed using a gas chromatograph (GC) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (MS) (Agilent technologies 5975C series, Palo Alto, CA, USA) operating in the electron capture negative ionization mode (GC/MS-ECNI) based on methods by Gentes et al. (2012). The analytical column (15 m X 0.25 mm X 0.10 μ m) was a fused-silica DB-5 HT capillary column (J & W Scientific, Brockville, ON, Canada). Quality control and assurance procedures included procedural method blanks, repeated analyses of a blue mussel sample, and standard reference material for which certified concentrations of PBDEs are available (NIST SRM 1947; Lake Michigan fish tissue). Mean (\pm SEM) recovery of ^{13}C -*syn*-DP was $98 \pm 2\%$. Concentrations of DP isomers were quantified using an internal standard approach, and thus all concentrations were inherently recovery-corrected. Concentrations of the five PBDE congeners (i.e., BDE-47, 99, 153, 154 and 183) in SRM 1947 ($n = 3$) showed less than 16.4% variation from the certified values.

2.2.4 Cell viability and phagocytosis

The viability of blue mussel hemocytes was assessed by flow cytometry using a Guava PCA flow cytometer and ViaCount solution kit (Guava technologies, Hayward, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, an aliquot of hemolymph was mixed with ViaCount and the fluorescence of 1,000 events was recorded for viability analysis. Phagocytic capacity (1 bead and more) and phagocytic efficiency (3 beads and more) were recorded by flow cytometry according to Brousseau et al. (1999). Hemocytes were mixed with yellow-green latex FluoresbriteTM Carboxylate microspheres (Polysciences, Warrington, PA, USA) at a ratio of 100:1 (beads: cell), and incubated at 15 °C for 18 h in the dark. After incubation, the cell suspensions were overlaid with 4 mL of RPMI medium supplemented with 3.5% of sea salt, and centrifuged at $150 \times g$ at 4 °C for 8 min. This step allowed removal of free and loosely adhered beads at the cell surface. The cell pellets were fixed in a solution of 0.5% formaldehyde in 3.5% salt water and 0.2% sodium azide (NaN_3).

Data acquisition was performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) equipped with a 488 nm argon laser based on methods by Brousseau et al. (1999). Ten thousand events were recorded per sample for phagocytosis analysis.

2.2.5 *In vitro* exposure

2.2.5.1 Phagocytosis

Hemolymph (500 μ L) of blue mussels was extracted from six individual mussels that were previously acclimatized in AAMW but not used for the *in vivo* DP exposure (section 2.1.1). An adjustment of cell concentration (50,000 hemocytes/mL) was made and the cells were transferred to 5 mL polypropylene tubes. Cells were incubated for 3 h with the same doses of DP (0.001, 0.01, 0.1, and 1.0 μ g/L) as used for the *in vivo* experiment. A control (artificial marine water (AMW) only) and a vehicle control (AMW and DMSO, 0.002%) were also included. After the incubation period, phagocytosis and cell viability were assessed as described in section 2.2.4.

2.2.5.2 Comet assay

Blue mussel hemocyte counts and mortality rates were determined by flow cytometry using the ViaCount solution kit following methods by Lacaze et al. (2015). This assay is based on the differential permeability of two DNA-binding dyes. Briefly, an aliquot of 50 μ L of hemolymph was mixed with 200 μ L of ViaCount and at least 5,000 events were recorded. Mussels ($n = 8$) that were not used for the *in vivo* DP exposure (previously acclimatized in AAMW) for whose cellularity of hemolymph was sufficient to test the entire concentration range of DP were selected. Hemolymph was diluted with AMW to 200,000 hemocytes per mL. For the exposure, stock solution of DP with DMSO was diluted in AMW at the same concentrations used for the *in vivo* exposure (0.001, 0.01, 0.1, and 1.0 μ g DP/L). A control (AMW only) and

vehicle control (AMW and DMSO 0.002%) were included. Cells were incubated at 15°C for 21 h in the dark under gentle shaking.

The Comet assay (alkaline version) was performed according to procedures described by Lacaze et al. (2015). Briefly, 20 μ L of exposed hemolymph was mixed with 20 μ L of 1% low melting point agarose prepared in saline phosphate buffered fixed at 37 °C. This mixture was spread on a frosted microscope slide precoated with normal agarose (1%), and covered with a 22 x 22 mm coverslip (two gels per slide). Coverslips were withdrawn after agarose polymerization (4 °C, 10 min.), and slides were incubated for 90 min in a lysing solution (2.5 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X 100; pH 10) at 4 °C in the dark. The slides were then submerged in an electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 1 mM Na₂EDTA; pH > 13) during 30 min to allow the unwinding of DNA. Electrophoresis was carried out at 25 V (0.61 V/cm) and 300 mA for 24 min. Slides were then washed three times for 5 min with a neutralization buffer (0.4 M Tris HCl; pH 7.5) and dried in absolute ethanol. After staining with diluted Sybr Green solution (1/5,000), slides were viewed using a fluorescence microscope (400X). Results were obtained by computerized scoring. Because of a lack of cells (cells/mussel ≤ 3) in hemolymph in 7 out of 8 blue mussels, no control group was added. The contribution of the effects of salt water solely was not considered in this test.

2.2.6 LPO analysis

Blue mussel gills were homogenized as described in section 2.2.1. LPO levels in gill homogenates were determined using thiobarbituric acid reactants (TBARS), which reacts with malonaldehyde following the oxidative breakdown of unsaturated phospholipids, using the methods described by Gagné et al. (2011a) with minor modifications. Tetramethoxypropane was used for the standard curve and blanks were prepared using the homogenization buffer. Fluorescence was measured at 535 nm

excitation and 635 nm emission, and the results were expressed as μg of TBARS/mg of proteins. The Pierce BCA protein assay kit (ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA) was used for protein content determination using the Bradford assay (Bradford, 1976) following the manufacturer's instructions.

2.2.7 Cyclooxygenase activity

Blue mussel gill homogenate samples were centrifuged at $15,000 \times g$ and the S15 fraction was used to determine COX activity based on the oxidation of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFD) in the presence of arachidonate as described by Gagné et al. (2011a). Briefly, gill homogenate S15 fractions were mixed with arachidonate, DCFD and horseradish peroxidase in a tris-HCl buffer (pH 8) containing 0.05% polysorbate 20 (Tween 20). The materialization of fluorescein was measured every 2 min for 30 min at 485 nm (excitation) and 520 nm (emission) with a spectrofluorometer (Spectra Max M5, molecular devices, Sunnyvale, CA, USA). Results were expressed in relative fluorescence units/min/mg of proteins.

2.2.8 Statistical analysis

Variables with or without transformation (i.e., log or square root) were checked for normality using the Shapiro-Wilk test. The homogeneity of variances was further verified using the Bartlett or Levene's test. Differences in LPO levels between treatment groups for the *in vivo* assay were tested using the Tukey's HSD test (pairwise comparison). Differences in COX activity, % tail DNA, phagocytosis capacity and efficiency, and viability of hemocytes between treatment groups for both *in vivo* and *in vitro* assays were tested using the Wilcoxon signed-rank test (pairwise comparison). Results are expressed as mean \pm standard error (SEM). The package

JUMP (SAS institute Inc., Cary, NC, USA) was used for statistical analysis. Results were considered significant when $p \leq 0.05$ or tendencies when $0.05 > p \leq 0.10$.

2.3 Results

2.3.1 *In vivo* exposure

2.3.1.1 Reproductive stage and gonadal integrity

Gonadal examination confirmed that all mussels in the present study were at reproductive resting stage. No histopathological lesion was found in gonads of blue mussels exposed to DP for any treatment groups (data not shown).

2.3.1.2 Bioaccumulation of DP

DP accumulated in blue mussel digestive gland and muscle homogenate tissues (pools) in a dose dependent manner (Table 2.1). More specifically, concentrations of *syn*-DP increased with approximately 10- to 11-fold between each treatment group, although this isomer could not be quantified in the 0.001 $\mu\text{g/L}$ dose. Comparatively, the concentration of *anti*-DP increased with approximately 7-fold between each treatment group. The ratio of *anti*-DP (f_{anti}) to $\sum\text{DP}$ (sum of *anti*- and *syn*-DP) concentrations in mussel tissues decreased slightly from the low, to the medium, to the high doses. The f_{anti} determined in the DP technical mixture for present study was 0.69.

Tableau 2. 1: Concentrations (ng/g ww) of DP isomers (*syn*- and *anti*-DP), lipid content (%) and f_{anti} in blue mussel digestive gland and muscle tissue homogenates exposed *in vivo* (29 d) to DP. Method limits of quantification (MLOQ) were 0.12 and 0.05 ng/g ww for *syn*-DP and *anti*-DP).

Treatment group	<i>syn</i> -DP (ng/g ww)	<i>anti</i> -DP (ng/g ww)	Lipid content	f_{anti}
Control (AAMW)	< MLOQ	< MLOQ	0.60	-
Vehicle control (AAMW and DMSO, 0.002%)	< MLOQ	< MLOQ	0.31	-
0.001 µg DP/L	< MLOQ	0.12	0.41	-
0.01 µg DP/L	0.14	0.84	0.57	0.86
0.1 µg DP/L	1.57	5.69	0.66	0.79
1.0 µg DP/L	15.5	42.3	0.53	0.73

2.3.1.3 Cell viability and phagocytosis

Following 29 d *in vivo* exposure, blue mussel hemocyte viability was above 80% for all treatment groups. No significant difference in hemocyte viability was found for any treatment groups compared to the vehicle control, although there was a difference with the control ($F_{5, 52} = 4.56$, $p = 0.002$) (Fig. 2.6). Moreover, no significant difference in phagocytosis activity was found between treatment groups and vehicle control for capacity (1 bead and more; $F_{5, 52} = 1.18$, $p = 0.33$) and efficiency (3 beads and more; $F_{5, 52} = 1.12$, $p = 0.36$) (Fig. 2.1).

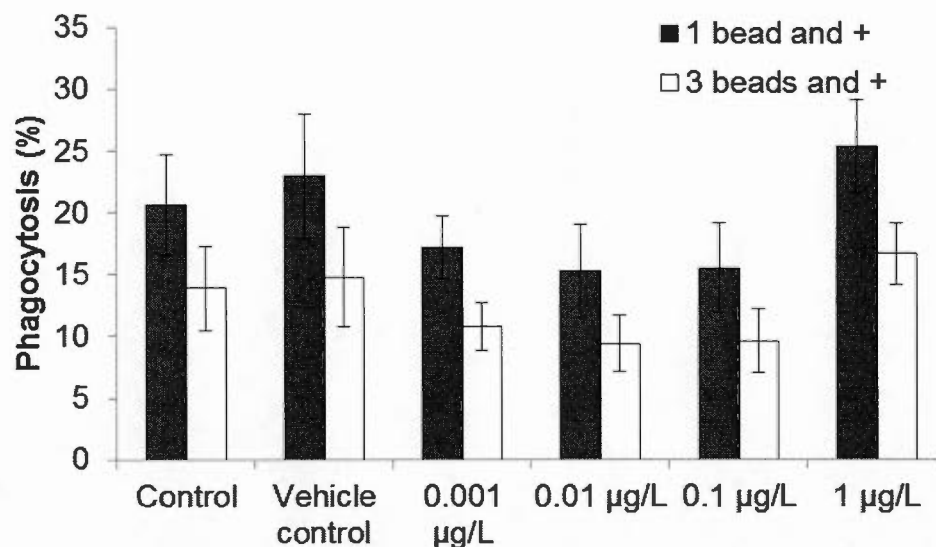


Figure 2. 1: Mean (\pm SEM) phagocytosis capacity (1 bead and more) and efficiency (3 beads and more) both expressed as % of phagocytosis activity in hemocytes of blue mussels following a 29 d *in vivo* exposure to DP.

2.3.2 *In vitro* exposure

2.3.2.1 Cell viability and phagocytosis

For the 3 h *in vitro* exposure, the hemocyte viability of blue mussels was above 70% for all treatment groups. No significant difference in hemocyte viability was found in any treatment groups compared to vehicle control ($F_{5, 30} = 1.21$, $p = 0.33$) (Fig. 2.7). Moreover, no significant difference in phagocytosis rate was found between treatment groups and vehicle control for capacity (1 bead and more; $F_{5, 29} = 0.36$, $p = 0.87$) and efficiency (3 beads and more; $F_{5, 29} = 0.25$, $p = 0.94$) (Fig. 2.2).

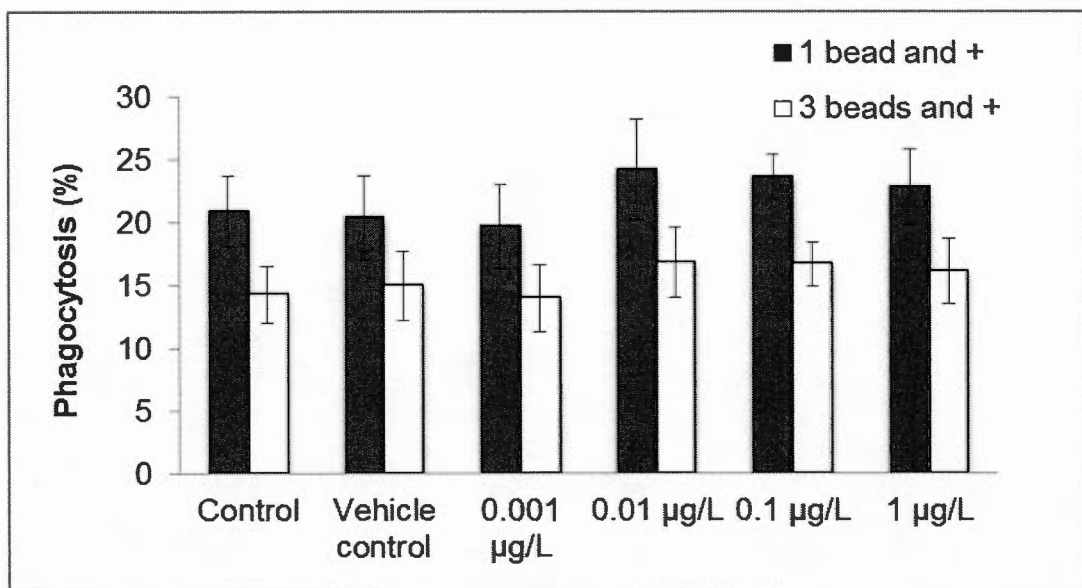


Figure 2. 2: Mean (\pm SEM) phagocytosis capacity (1 bead and more) and efficiency (3 beads and more) both expressed as % of phagocytosis activity in hemocytes of blue mussels following a 3 h *in vitro* exposure with DP.

2.3.2.2 DNA damage

No significant difference was found in blue mussel hemocyte viability between treatment groups and vehicle control after the 21 h *in vitro* exposure with DP in the Comet assay ($F_{4, 20} = 0.19$, $p = 0.94$). Moreover, no significant DNA strand breakage frequency was measured in hemolymph cells between the treatment groups and vehicle control ($F_{4, 20} = 0.66$, $p = 0.63$) (Fig. 2.3).

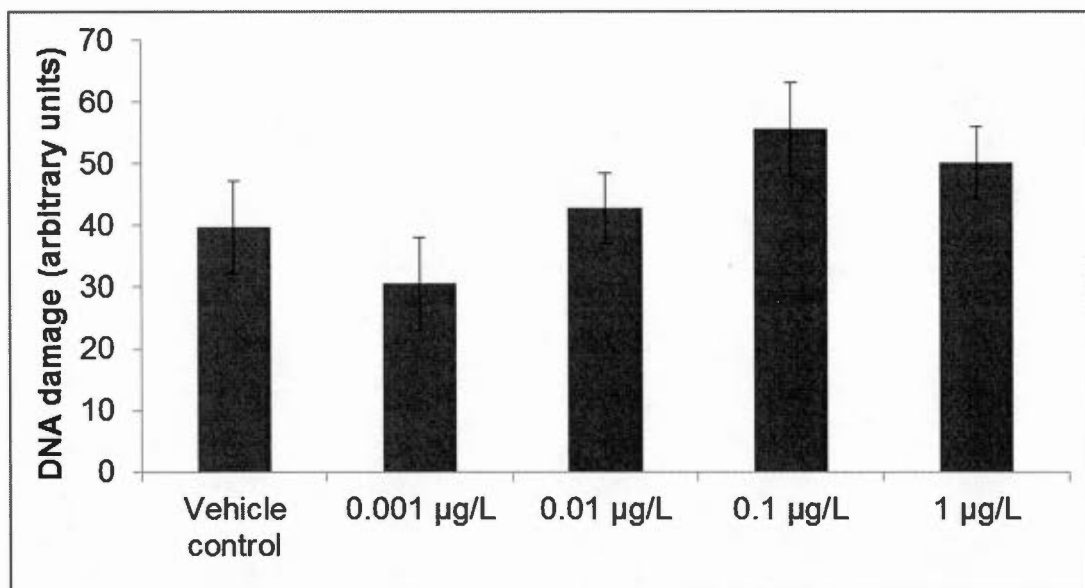


Figure 2. 3: Mean (\pm SEM) DNA strand breakage in blue mussel hemocytes following a 21 h *in vitro* exposure to DP.

2.3.3 LPO levels

Blue mussel gill homogenates exposed to DP showed a significantly greater LPO levels (82% increase) at the 0.01 $\mu\text{g/L}$ dose compared to the vehicle control ($F_{5, 52} = 9.48, p < 0.0001$). A tendency for greater LPO levels (67% increase) in gills was also found at the 1.0 $\mu\text{g/L}$ dose in gills compared to the vehicle control (Fig. 2.4).

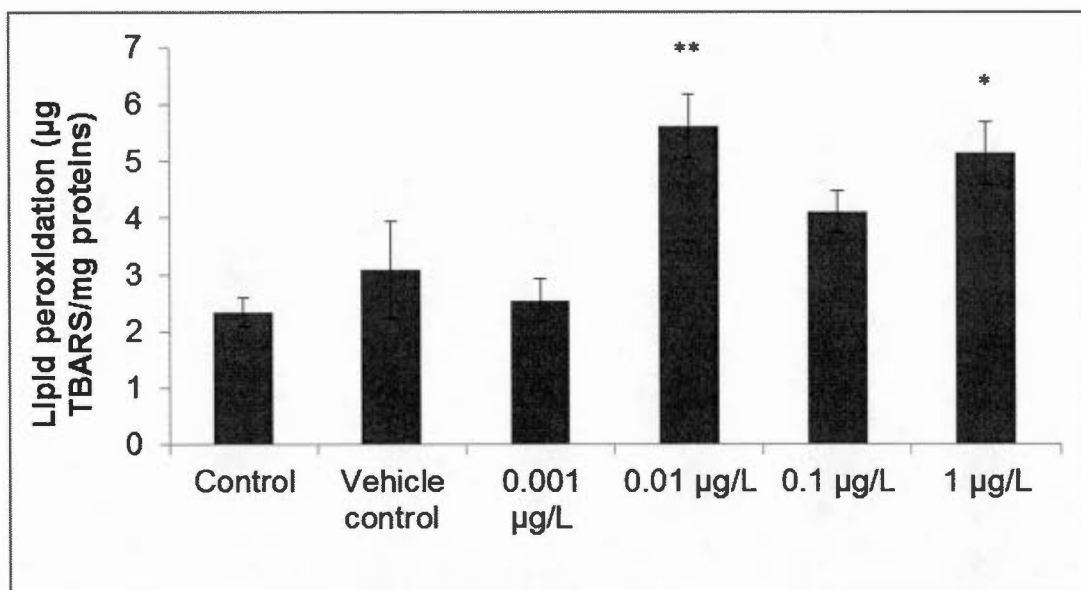


Figure 2. 4: Mean (\pm SEM) LPO levels in blue mussel gill homogenates following *in vivo* exposure to DP. The * indicates a tendency, while ** indicates a significant difference compared to the vehicle control.

2.3.4 COX activity

COX activity in blue mussel gills was significantly lower (44% decrease) in the 1.0 µg/L dose compared to vehicle control ($F_{5, 52} = 4.36, p = 0.002$) (Fig. 2.5).

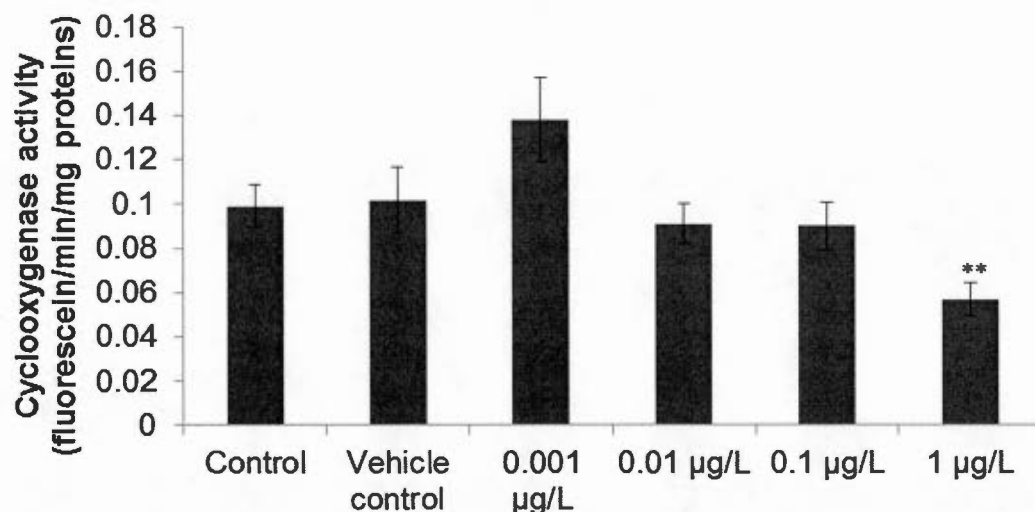


Figure 2. 5: Mean (\pm SEM) COX activity in blue mussel gills following *in vivo* assay with DP. The ** indicate a significant difference between treatment group and vehicle control.

2.4 Discussion

The present blue mussel study showed that *in vivo* exposure to DP at environmental and greater concentrations resulted in dose-dependent tissue accumulation (i.e., muscle and digestive gland) that was associated with induction of oxidative stress (i.e., increased LPO levels) and decreased COX activity in gills. No effect was observed on gonad histology, phagocytosis, viability and DNA integrity in hemolymph.

2.4.1 Bioaccumulation of DP

The *in vivo* exposure to the DP resulted in a dose-dependent bioaccumulation (7 to 11-fold increase) of both DP isomers in blue mussel tissues. These results were consistent with a study by Barón et al. (2016) that reported in Mediterranean mussels exposed to greater concentrations of DP (5.6, 56, 100 µg/L) than that DP also accumulated in a dose-dependent manner (2-fold increase between doses). The f_{anti}

determined in present blue mussel tissue homogenates (0.73-0.86) were slightly greater to that determined in the DP technical mixture in our laboratory (0.69) for the present study, and were within the same range as those reported by Tomy et al. (2007) (f_{anti} : 0.65) and Qiu et al. (2007) (f_{anti} : 0.75) for mixtures supplied by Wellington laboratories and OxyChem, respectively. Furthermore, the f_{anti} reported in Mediterranean mussel hemolymph in the Barón et al. (2016) study (0.74, 0.69 and 0.73 for the low, medium and high doses, respectively) were within the same range as those determined in muscles and digestive glands of present mussels. However, in this study, no dose-dependent increase of f_{anti} was observed in contrast with our study. Studies have shown a stereoselective accumulation of DP that may explain the differences in f_{anti} values in aquatic species (Tomy et al., 2007; He et al., 2014). For example, the f_{anti} values determined in present blue mussels were greater compared to fish from the Pearl river delta in China (He et al., 2014) (0.59-0.71) and lake Ontario (Tomy et al., 2007) (0.65), while other f_{anti} values reported in fish from Lake Winnipeg were even greater (0.96 and 0.93). This suggests that DP isomers in aquatic organisms are bioaccumulated in a species-specific manner. However, there is exceedingly limited information available on the biotransformation of DP isomers in these organisms. Moreover, due to their hydrophobicity ($\log K_{ow} > 7$) and very low vapor pressures ($P_s < 6\text{-}10$ Pa), obtaining reliable measurements of their physicochemical properties is a technical challenge (Sverko et al., 2011). Nevertheless, Sverko et al. (2011) reported the formation of DP monoadducts and other dechlorinated products in lake trout that were suggested to be formed through metabolic transformation. No dechlorinated product of DP were found in present blue mussels (data not shown; DP monoadducts were not analyzed).

2.4.2 Phagocytosis

No impairment of phagocytosis and viability in hemocytes was observed for the *in vivo* and *in vitro* exposure to DP in hemolymph. There is, to our knowledge, no

information available on the immunotoxicity of DP in bivalves or any other aquatic organisms. However, studies have reported impaired viability and phagocytosis capacity in aquatic organisms following exposure to other organochlorines. For example, Liu et al. (2009) observed significant decrease in phagocytosis rate in scallops (*Chlamys farreri*) following 1 to 30 d exposure to the commercial PCB mixture Aroclor 1254 for all doses investigated (0.05, 0.5, 5 and 50 µg/L). Anguiano et al. (2007) further reported a significant decrease in hemocytes viability in oysters (*Crassostrea gigas*) exposed to lindane for the 1 and 5 mg/L dose after 12 d. This suggests that with respect to phagocytosis, DP alone does not represent an immunotoxic compound in blue mussels at the current environmental concentrations (0.001 and 0.1 µg/L) and even greater (10- to 100- fold higher concentrations).

2.4.3 DNA damage

The *in vitro* DP exposure using mussel hemocytes revealed no effect on DNA strand breakage. In contrast, Barón et al. (2016) reported significant increase in DNA strand breakage and an induction of micronuclei in Mediterranean mussel hemocytes following DP exposure, although at much greater doses (5.6-100 µg/L) compared to those used in the present study. Dou et al. (2015) further observed significant DNA strand breakage in luminous bacteria (*Tetrahymena thermophila*) after 30 min exposure to DP at even greater concentrations (300-1,500 µg/L). Moreover, Riva et al. (2007) reported induction of DNA damage in zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemolymph following 48 to 168 h exposure to BDE-209 at all doses (0.1-10 µg/L). Collectively, these findings suggest that DP doses far greater than those found in the environment would be required to elicit a genotoxic response in blue mussel.

2.4.4 Gills integrity and oxidative stress

Blue mussels exposed to DP exhibited significant increase in LPO levels in gills at 0.01 $\mu\text{g/L}$ (environmental dose), and a tendency for increasing LPO levels at the greatest dose (1.0 $\mu\text{g/L}$). Enhanced lipid peroxidation in blue mussel gills exposed to DP may result in damage to lipid-based membranes (Wong-ekkabut *et al.*, 2007). As such, DP exposure-related oxidative stress could alter functions and structures of cellular phospholipid-based components, but also proteins, carbohydrates and DNA structure, thus leading to cell death (Sheehan and McDonagh, 2008). Barón *et al.* (2016) investigated the oxidative stress response in Mediterranean mussels exposed to DP at three doses (5.6, 56 and 100 $\mu\text{g/L}$) and reported a significant increase of DNA strand breakage in hemolymph for all three doses. Hu *et al.* (2015) further showed that levels of LPO in the Chinese scallop following a 10 d exposure to tetrabromobisphenol A (TBBPA) increased significantly in a dose-dependent manner. Another study using a saltwater clam (*Venerupis philippinarum*) exposed *in vivo* to hexabromocyclododecane (HBCDD) during 15 d reported significantly greater LPO levels in gills (Zhang *et al.*, 2014). In contrast, Lemiere *et al.* (2005) reported a poor correlation between induction of DNA strand breakage and LPO in gills of a freshwater bivalve (*Unio tumidus*) exposed to PAHs. It was suggested in the study that a detoxification response could have been involved via certain antioxidant activities, i.e., glutathione-s-transferase and superoxide dismutase (SOD) as for example shown by Hu *et al.* (2015) and Zhang *et al.* (2014). Therefore, present results in blue mussels indicate that LPO levels in gills might have been regulated by antioxidant mechanisms, e.g. glutathione (GHS) and SOD, which would warrant further investigation.

2.4.5 COX activity

A significant decrease in COX activity in gills of exposed *in vivo* blue mussel gills was measured for the greatest DP dose only. COX activity was determined by Hong

et al. (2014) following exposure to HBCDD in medaka embryos at relatively high doses (i.e., 5, 20, 50 $\mu\text{g/L}$), although no significant change in COX was observed. In contrast, Gagné et al. (2005) observed a significant increase in COX activity and inflammatory response in gills and gonads of eastern elliptio (i.e., *Elliptio complanata*) following exposure to municipal wastewater effluent and its organic extract (i.e., solid-phase methanolic extract). The latter study also found a decreased in COX activity in gonads and gills following injection (in anterior adductor muscle) of the anti-inflammatory drug ibuprofen, which confirmed the role of COX in the inflammatory response of bivalves. It has been shown that COX possesses one isoenzyme related to the normal cell functions (COX-1) while the other (COX-2) plays a role in inflammatory response. In bivalves, COX is considered essential in ovulation, blastocyst implantation, inflammation and T cell development in vertebrates (e.g., mice) (Smith and Langenbach, 2001). However, in bivalves, COX plays a role in the production of prostaglandins and modulates the effect of serotonin in the spawning process, as it was shown in the Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) (Matsutani and Nomura, 1987). The depletion of COX activity at the highest DP dose may thus have implications in the control of reproduction in blue mussels.

2.5 Conclusions

DP exposure in blue mussels resulted in dose-dependent accumulation and induced an increase in LPO levels at an environmental concentration, thus suggesting an oxidative stress response in gills. Also, COX activity in gills significantly decreased at the highest DP dose of exposure. To gain better insight into the oxidative stress response in gills of blue mussel, investigation of antioxidant mechanisms (e.g., glutathione and superoxide dismutase) should be performed. Furthermore, the effect of DP on COX activity may have deleterious impact on the reproductive system of blue mussel (e.g., spawning), which would need further research. In view of the

increased production of DP as putative Deca-BDE replacement product and its growing detection in aquatic organisms, including its metabolic products, DP should be the subject of long-term toxicity studies and environmental scrutiny.

Acknowledgments

This work was funded primarily by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (to J.V.). Supplemental funding was provided by the CINBIOSE (to C.V.) and TÉLUQ (to L.P.). The authors would like to thank Dr. Émilie Lacaze and Alexandre Beaudry for their assistance with the Comet assay and histopathology analyses, respectively. The authors declare they have no conflicts of interest.

2.6 References

- Anantharaman, S., Craft, J. A. 2012. Annual variation in the levels of transcripts of sex-specific genes in the mantle of the common mussel, *Mytilus edulis*. PLoS One. 7, 1-10.
- Anguiano, G., Llera-Herrera, R., Rojas, E., Vazquez-Boucard, C. 2007. Subchronic organismal toxicity, cytotoxicity, genotoxicity, and feeding response of pacific oyster (*crassostrea gigas*) to lindane (g-HCH) exposure under experimental conditions. Environ. Toxicol. Chem. 26, 2192-2197.
- Arkoosh, M.R., Boylen, D., Dietrich, J., Anulacion, B.F., Ylitalo, G., Bravo, C.F., Johnson, L.L., Loge, F.J. et Collier, T.K. 2010. Disease susceptibility of salmon exposed to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). Aquat. Toxicol. 98, 51-59.
- Barón, E., Dissanayake, A., Vila, J., Crowther, C., Readman, J. W., Jha, A., Eljarrat, E., Barceló, D. 2016. Evaluation of the genotoxic and physiological effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and Dechlorane plus (DP) flame retardants in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Environ. Sci. Technol. 50, 2700-2708.
- Bergman, Å.; Rydén, A.; Law, R.J.; de Boer, J.; Covaci, A.; Alaee, M.; Birnbaum, L.; Petreas, M.; Rose, M.; Sakai, S.; Van den Eede, N.; Van der Veen, I. 2012. A novel abbreviation standard for organobromine, organochlorine and organophosphorus flame retardants and some characteristics of the chemicals. Environ. Int. 49, 57-82.
- Blaise, C., Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C., Hansen, P.-D. 2002. Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by a miniaturized phagocytosis assay. Environ. Toxicol. 17, 160-169.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brooks, S., Lyons, B., Goodsir, F., Bignell, J., Thain, J. 2009. Biomarker responses in mussels, an integrated approach to biological effects measurements. *J. Toxicol. Environ. Heal., Part A.* 72, 196-208.
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D., Fournier, M. 1999. *Manual of immunological methods*, first edition, CRC press LLC., Florida
- Chen, D.; Martin, P.; Burgess, N.M.; Champoux, L.; Elliott, J.E.; Forsyth, D.J.; Idrissi, A.; Letcher, R.J. 2013. European starlings (*Sturnus vulgaris*) suggest that landfills are an important source of bioaccumulative flame retardants to Canadian terrestrial ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 47, 12238-12247.
- Croxtton, A.N., Wikfors, G.H. Sculterbrandt-Gragg, R.D. 2012. Immunomodulation in eastern oysters, *Crassostrea virginica*, exposed to PAH-contaminated, microphytobenthic diatom. *Aquat Toxicol.* 118-119, 27-36.
- Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P. M., Franco, J., Larreta, J. 2015. Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad mussels: integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquat. Toxicol.* 162, 152-164.
- Dou, J., Jin, Y., Li, Y., Wu, B., Li, M. 2015. Potential genotoxicity and risk assessment of a chlorinated flame retardant, Dechlorane plus. *Chemosphere.* 135, 462-466.

EPA, US. 2014. An alternatives assessment for the flame retardant decabromodiphenyl ether (DecaBDE).

https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-05/documents/decabde_final.pdf.

(Accessed april 3, 2016).

EPA, US. 2015. Substance registry service: Bis(hexachlorocyclopentadieno)cyclooctane.

https://iaspub.epa.gov/sor_internet/registry/substreg/searchandretrieve/advancedsearch/externalSearch.do?p_type=CASNO&p_value=13560-89-9#HealthAndOther.

(Accessed july 31, 2016).

Fang, M., Kim, J.-C., Chang, Y.-S. 2014. Investigating Dechlorane plus (DP) distribution and isomer specific adsorption behavior in size fractioned marine sediments. *Sci. Total Environ.* 481, 114-120.

Feo, M. L., Barón, E., Eljarrat, E., Barceló, D. 2012. Dechlorane plus and related compounds in aquatic and terrestrial biota: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2625-2637.

Gagné, F., Bérubé, E., Fournier, M., Blaise, C. 2005. Inflammatory properties of municipal effluents to *Elliptio complanata* mussels-lack of effects from anti-inflammatory drugs. *Comp. Biochem. Physiol. Part C.* 141, 332-337.

Gagné, F., Blaise, C., André, C., Gagnon, C., Salazar, M. 2007. Neuroendocrine disruption and health effects in *Elliptio complanata* mussels exposed to aeration lagoons for wastewater treatment. *Chemosphere.* 68, 731-743.

Gagné, F., André, C., Cejka, P., Hausler, R., Fournier, M. 2011a. Evidence of neuroendocrine disruption in freshwater mussels exposed to municipal wastewaters. *Sci. Total Environ.* 409, 3711-3718.

- Gagné, F., Bouchard, B., André, C., Farcy, E., Fournier, M. 2011b. Evidence of feminization in wild *Elliptio complanata* mussels in the receiving waters downstream of a municipal effluent outfall. *Comp. Biochem. Physiol., Part C.* 153, 99-106.
- Gentes, M.-L., Letcher, R.J., Caron-Beaudoin, É., Verreault, J. 2012. Novel flame retardants in urban-feeding ring-billed gulls from the St. Lawrence river, Canada. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9735-9744.
- He, M.-J.; Luo, X.-J.; Wu, J.-P.; Chen, S.-J.; Wei, S.-Q.; Mai, B.-X. 2014. Isomers of Dechlorane plus in an aquatic environment in a highly industrialized area in Southern China: spatial and vertical distribution, phase partition, and bioaccumulation. *Sci. Total Environ.* 481, 1-6.
- Hong, H., Li, D., Shen, R., Wang, X., Shi, D. 2014. Mechanisms of hexabromocyclododecanes induced developmental toxicity in marine medaka (*Oryzias melastigma*) embryos. *Aquat. Toxicol.* 152, 173-185.
- Houde, M., Berryman, D., de Lafontaine, Y., Verreault, J. 2014. Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence river, Canada. *Sci. Total Environ.* 479-480, 45-56.
- Hu, F., Pan, L., Xiu, M., Jin, Q. 2015. Exposure of *Chlamys farreri* to tetrabromobisphenol A: bioaccumulation and multibiomarker responses. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 12224-12234
- Jia, H., Sun, Y., Liu, X., Yang, M., Wang, D., Qi, H., Shen, L., Sverko, E., Reiner, E. J., Li, Y.-F. 2011. Concentration and bioaccumulation of Dechlorane plus compounds in coastal environment of Northern China. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2613-2618.
- Joy, M.; Chakraborty, K.; Panhangat, V. 2016. Comparative bioactive properties of bivalves clams against different disease molecular targets. *J. Food Biochem.* 40, 1-10.

- Lacaze, E., Pedelucq, J., Fortier, M., Brousseau, P., Auffret, M., Budzinski, H., Fournier, M. 2015. Genotoxic and immunotoxic potential effects of selected psychotropic drugs and antibiotics on blue mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes. Environ. Pollut. 202, 177-186.
- Lemiere, S., Cossu-Leguille, C., Charissou, A.-M., Vasseur, P. 2005. DNA damage (comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve *Uno tumidus*. Biomark. 10, 41-57.
- Liu, J., Pan, L.-Q., Zhang, L., Miao, J., Wang, J. 2009. Immune responses, ROS generation and the haemocyte damage of scallop *Chlamys farreri* exposed to Aroclor 1254. Fish Shellfish Immunol. 26, 422-428.
- Lv, Q. - Y., Wan, B., Guo, L. - H., Zhao, L., Yang. 2015. *In vitro* immune toxicity of polybrominated diphenyl ethers on murine peritoneal macrophages: apoptosis and immune cell dysfunction. Chemosphere. 120, 621-630.
- Matsutani, T., Nomura, T. 1987. *In vitro* effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Gen. Comp. Endocrinol. 67, 111-118.
- Pichaud, N., Pellerin, J., Fournier, M., Gauthier-Clerc, S., Rioux, P., Pelletier, É. 2008. Oxidative stress and immunologic responses following a dietary exposure to PAHs in *Mya arenaria*. Chem. Cent. J. 2, 1-11.
- Qiu, X., Marvin, C.H., Hites, R.A. 2007. Dechlorane plus and other flame retardants in a sediment core from lake Ontario. Environ. Sci. Technol. 41, 6014-6019.
- Riva, C., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A. 2007. Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether (BDE-209) in hemocytes of *Dreissena*

polymorpha using the comet and micronucleus assays. Environ. Mol. Mutagen. 48, 735-743.

Ruiz, Y., Suarez, P., Alonso, A., Longo, E., Villaverde, A., San Juan, F. 2011. Environmental quality of mussel farms in the Vigo estuary: pollution by PAHs, origin and effects on reproduction. Environ. Pollut. 159, 250-265.

Seed, R. 2009. Ecology, in: Bayne, B.L. (Ed.) Marine mussels: their ecology and physiology. Cambridge university press, New York, pp. 13-65.

Sheehan, D., McDonagh, B. 2008. Oxidative stress and bivalves: a proteomic approach. Invertebr. Surviv. J. 5, 110-123.

Shen, L., Reiner, E.J., Macpherson, K.A., Kolic, T.M., Helm, P.A., Richman, L.A., Marvin, C.H., Burniston, D.A., Hill, B., Brindle, I.D., McCrindle, R., Chittim, B.G. 2011. Dechloranes 602, 603, 604, Dechlorane plus, and Chlordene plus, a newly detected analogue, in tributary sediments of the Laurentian Great Lakes. Environ. Sci. Technol. 45, 693-699.

Shimkawa, T., Smith, W.L. 1992. Prostaglandins endoperoxide synthase. J. Biol. Chem. 267, 12387-12392.

Sun, R.-X., Luo, X.-J., Tan, X.-X., Tang, B., Li, Z.-R., Mai, B.-X. 2015. Legacy and emerging halogenated organic pollutants in marine organisms from the Pearl river estuary, south China. Chemosphere. 139, 565-571.

Sverko, E., Reiner, E.J., Tomy, G.T., McCrindle, R., Shen, L., Arsenault, G., Zaruk, D., Macpherson, K.A., Marvin, C.H., Helm, P.A., McCarthy, B.E. 2010. Compounds structurally related to Dechlorane plus in sediment and biota from Lake Ontario (Canada). Environ. Sci. Technol. 44, 574-579.

Sverko, E.; Tomy, G.T.; Reiner, E.J.; Li, Y.-F.; McCarry, B.E.; Arnot, J.A.; Law, R.J.; Hites, R.A. 2011. Dechlorane plus and related compounds in the environment: a review. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5088-5098.

Tomy, G.T., Pleskach, K., Ismail, N., Whittle, D.M., Helm, P.A., Sverko, E., Zaruk, D., Marvin, C.H. 2007. Isomers of Dechlorane plus in lake Winnipeg and lake Ontario food webs. *Environ. Sci. Technol.* 41, 2249-2254.

UN. 2009. Stockholm convention on persistent organic pollutants Stockholm, 22 may 2001.

<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/TheNewPOPs/tabid/2511/Default.aspx>. (accessed may 31, 2016).

UN. 2015. Persistent Organic Pollutants review committee eleventh meeting, 19-23 october 2015.

<http://chm.pops.int/TheConvention/POPsReviewCommittee/Meetings/POPRC11/Overview/tabid/4558/ctl/Download/mid/13905/Default.aspx?id=41&ObjID=20956>.

(Accessed august 1, 2016).

Villaverde-de-Sáa, E.; Valls-Cantenys, C.; Quintana, J.B.; Rodil, R.; Cela, R. 2013. Matrix solid-phase dispersion combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of fifteen halogenated flame retardants in mollusks. *J. Chromatogr. A* 1300, 85-94.

Wang, P., Zhang, Q., Zhang, H., Wang, T., Sun, H., Zheng, S., Li, Y., Liang, Y., Jiang, G. 2016. Sources and environmental behaviors of Dechlorane plus and related compounds-A review. *Environ. Int.* 88, 206-220.

Wong-ekkabut, J., Xu, Z., Triampo, W., Tang, I.-M., Tieleman, D.P., Monticelli, L. 2007. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Biophysical journal*, 93, 4225-4236.

Wu, H.-P., Zhang, Y., Luo, X.-J., Wang, J., Chen, S.-J., Guan, Y.-T., Mai, B.-X. 2010. Isomer-specific bioaccumulation and trophic transfer of Dechlorane plus in the freshwater food web from a highly contaminated site, South China. *Environ. Sci. Technol.* 44, 606-611.

Xiang, N., Chen, L., Meng, X.-Z., Li, Y.-L., Liu, Z., Wu, B., Dai, L., Dai, X. 2014. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and Dechlorane plus (DP) in a conventional wastewater treatment plant (WWTP) in Shanghai: seasonal variations and potential sources. *Sci. Total Environ.* 487, 342-349.

Yang, Y.; Ji, F.; Cui, Y.; Li, M. 2016. Ecotoxicological effects of earthworm following long-term Dechlorane plus exposure. *Chemosphere.* 144, 2476-2481.

Zhang, Y., Wu, J.-P., Luo, X.-J., Wang, J., Chen, S.-J., Mai, B.-X. 2011. Tissue distribution of Dechlorane plus and its dechlorinated analogs in contaminated fish: high affinity to the brain for *anti*-DP. *Environ. Pollut.* 159, 3647-3652.

Zhang, H., Pan, L., Tao, Y. 2014. Antioxydant responses in clam *Venerupis philippinarum* exposed to environmental pollutants hexabromocyclododecane. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 8206-8215.

2.7 Supplemental data

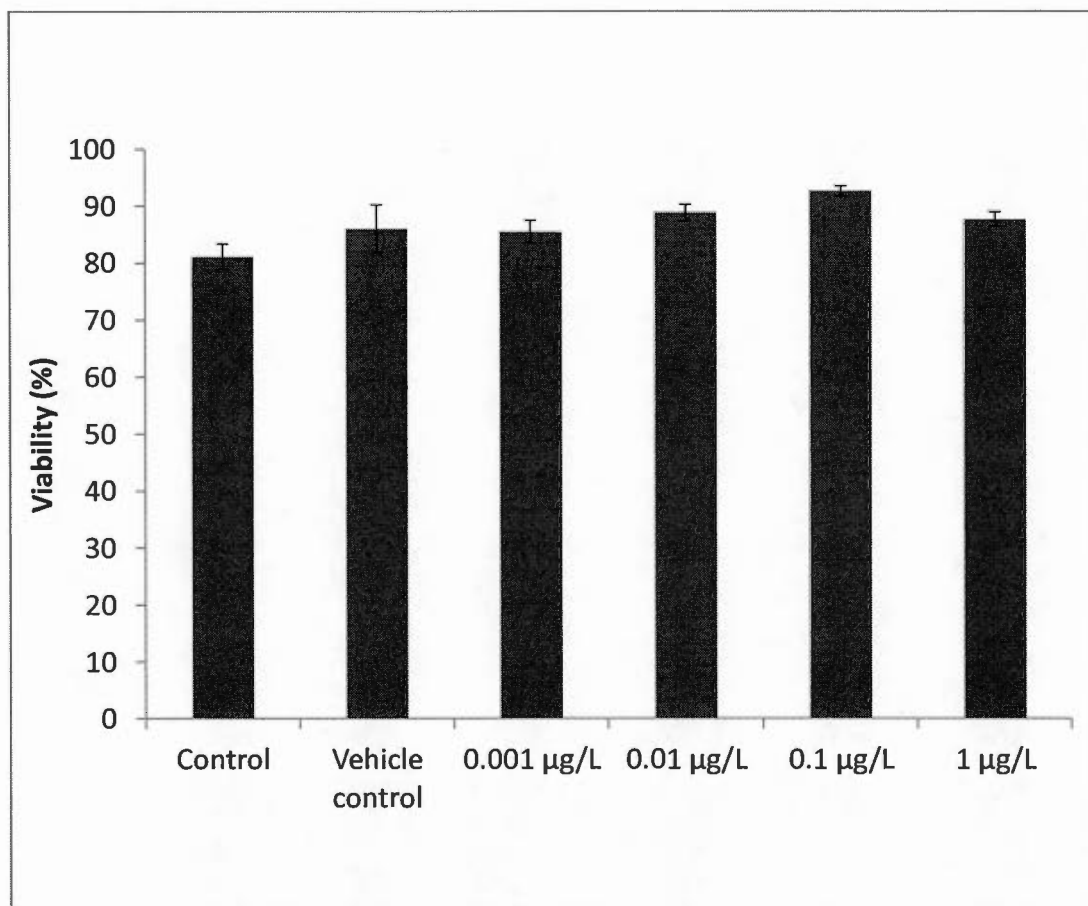


Figure 2. 6: Mean (\pm SEM) viability expressed as % viability of hemocytes of blue mussels following a 29 days *in vivo* exposure to DP.

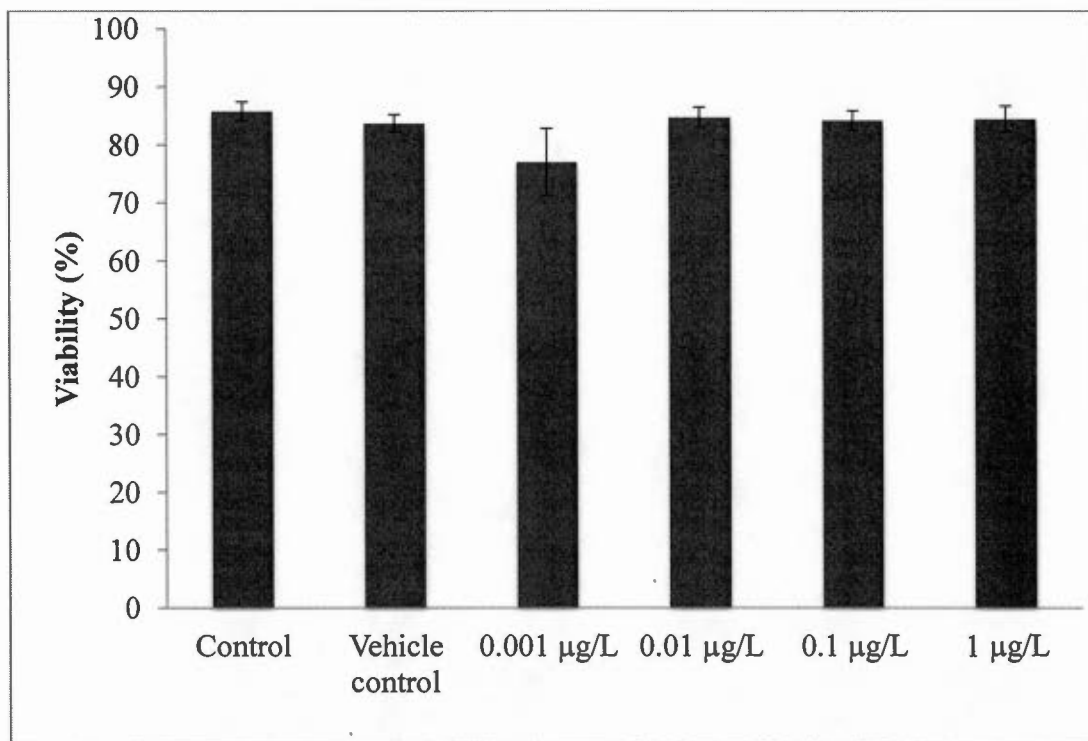


Figure 2. 7: Mean (\pm SEM) viability expressed as % viability of hemocytes of blue mussels following a 3 h *in vitro* exposure to DP.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Étant donné la carence d'informations sur la toxicité du DP chez les organismes aquatiques, ce mémoire a eu pour objectif d'évaluer le portrait de la bioaccumulation du DP et d'identifier des effets toxicologiques du DP à des concentrations environnementales, et au-delà, sur la moule bleue, dans des conditions *in vivo* et *in vitro*, en utilisant quelques biomarqueurs liés à 1) l'immunotoxicité et 2) le stress oxydant (i.e., peroxydation des lipides dans les branchies), 3) la génotoxicité (i.e., la rupture de brins d'ADN dans l'hémolymphe), 4) la reprotoxicité (i.e., l'activité de la cyclooxygénase) dans les branchies, et 5) les microlésions ou histopathologies dans les gonades. Les hypothèses avancées sont donc qu'il y aura 1) une bioaccumulation spécifique du DP chez la moule bleue selon la dose et que 2) des effets toxicologiques seront relevés, particulièrement au niveau de l'intégrité physiologique des gonades (microlésions ou histopathologies), et des réponses immunotoxiques (viabilité cellulaire, phagocytose), génotoxiques (ruptures de brin d'ADN) dans les cellules de l'hémolymphe, et la manifestation de stress oxydatif et une modification de l'activité de la cyclooxygénase dans les branchies en fonction de la dose de DP.

Premièrement, les résultats ont démontré que le portrait d'accumulation du DP et des isomères chez la moule bleue suivait une courbe dose-dépendante. De plus, le ratio de l'isomère *anti*-DP par rapport à la somme de la concentration des deux isomères du DP diminuait avec l'augmentation de la dose, ce qui suggère une dégradation de l'isomère *anti*- dans la glande digestive et dans les muscles. Par contre, peu d'études sur la dégradation du DP dans les tissus d'organismes aquatiques ont été entreprises, à l'exception de deux études *in vivo* sur l'omble du Canada (Tomy *et al.* (2008)) et

l'anguille d'Europe (Sühling *et al.* (2015)). La première étude n'a observée aucune présence de métabolites dans les tissus de foie analysés à la suite de l'exposition des deux isomères du DP sur l'omble du Canada pendant 48 jours. La deuxième étude, quant à elle, a détecté plusieurs métabolites dans les muscles de l'anguille d'Europe, e.g., deux produits de déchloration du DP (aCl10DP et aCl11DP) et un monoadduit du DP (DPMA), suite à l'exposition de deux systèmes de drainage situés dans la rivière Ems près du fjord de Schlei dans le nord de l'Allemagne. Étant donné que nous n'avons pas poussé l'examen de sous-produits du DP dans les tissus analysés, des recherches dans ce sens pourraient donc être entamées chez la moule bleue, afin de comprendre si des sous-produits du DP plus toxiques peuvent avoir eu une influence sur les résultats obtenus dans les tissus analysés. Nonobstant, ce portrait d'accumulation stéréoisomérique du DP a confirmé son caractère interspécifique par rapport à d'autres espèces aquatiques étudiées dans les Grands Lacs (Tomy *et al.*, 2007).

Deuxièmement, l'étude de la toxicité du DP a révélé une absence de microlésions dans les gonades, et aucun effet n'a été observé sur l'activité phagocytaire, sur la viabilité cellulaire et sur les dommages liés à l'ADN dans l'hémolymphe. Par contre, la toxicité du DP a été observée dans l'augmentation de la peroxydation des lipides à une dose environnementale (0.01 µg/L) et au-delà (1.0 µg/L), et une diminution de la cyclooxygénase à la plus haute dose testée (1.0 µg/L) dans les branchies. Cela suggère donc la production d'un stress oxydant, ainsi que des effets possiblement délétères au niveau du système immunitaire (i.e., l'inflammation) et du système reproducteur (i.e., sur la production de la prostaglandine), particulièrement au niveau de la production des œufs. La présence de stress oxydant à une dose environnementale (i.e., 0.01 µg/L) et au-delà (1.0 µg/L) suggère une détoxification de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) dans les branchies, grâce à l'action à rebours d'antioxydants (e.g., glutathion-s-transférase) et d'enzymes (e.g., superoxyde dismutase), comme cela a été observé dans l'étude de Lemiere *et al.*,

(2005). Des recherches sur les mécanismes de détoxification des ROS, comme cause possible de stress oxydant dans les branchies, doivent être envisagées. De plus, des études ont démontré que l'exposition à des composés organiques polycycliques (Hu *et al.* (2015) et Zhang *et al.*, (2014)), i.e., deux retardateurs de flamme polybromés, (hexabromocyclododécane (HBCD) et tétrabromobisphénol A (TBBPA)), provoquent un stress oxydant, i.e., augmentation de la peroxydation des lipides, tant dans les branchies que dans la glande digestive chez deux bivalves d'eau marine (i.e., *Chlamys farreri* et *Venerupis philippinarum*, respectivement) pour toutes les doses testées (i.e., 0,2 à 0,8 mg/L et 0,086 à 8,6 µg/L, respectivement). De plus, la peroxydation des lipides et l'activité de la cyclooxygénase ont été étudiées antérieurement dans les gonades (Gagné *et al.*, 2011) et l'hémolymph (Gagné *et al.*, 2012), afin d'étudier les effets délétères au niveau du système reproducteur et immunitaire, respectivement, d'une exposition à des eaux usées municipales chez une moule d'eaux douces (i.e., *Elliptio complanata*). Nos résultats sur l'activité de la COX et la peroxydation des lipides suggèrent que la toxicité du DP dans les branchies est probablement présente dans d'autres tissus, particulièrement dans les gonades, étant donné l'absence de réponses immunotoxiques dans l'hémolymph. Cela nécessite donc d'autres recherches sur les effets du DP sur le système reproducteur et l'intégrité des tissus, liée à l'activité de la cyclooxygénase et au stress oxydant, dans les gonades chez la moule bleue.

Étant donné que le DP est considéré comme produit de remplacement à plusieurs solutions commerciales contenant du PBDE et que son utilisation n'est pas sur le point de diminuer, comprendre la toxicité du DP sur une espèce marine sentinelle permet de combler une carence d'informations écotoxicologiques. De plus, les résultats obtenus ont révélé des effets à court et moyen termes du DP chez la moule bleue. Les recherches futures devraient également traiter sur les effets à long terme du DP grâce à des recherches sur le terrain en utilisant la même espèce aquatique, c'est-à-dire la moule bleue.

BIBLIOGRAPHIE

- Alaee, M., Arias, P., Sjödin, A. et Bergman, Å. (2003). An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment international*, 29, 683-689
- Barón, E., Dissanayake, A., Vilà-Cano, J., Crowther, C., Readman, J.W., Jha, A.N., Eljarrat, E. et Barceló, D. (2016). Evaluation of the genotoxic and physiological effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and Dechlorane plus (DP) flame retardants in marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Environmental science and technology*, 50, 2700-2708
- Bergman, Å., Rydén, A., Law, R.J., de Boer, J., Covaci, A., Alaee, M., Birnbaum, L., Petreas, M., Rose, M., Sakai, S., den Eede, N.V et van der Veen, I. (2012). A novel abbreviation standard for organobromine, organochlorine and organophosphorus flame retardant and some characteristics of the chemicals. *Environment international*, 49, 57-82
- Brooks, S., Lyons, B., Goodsir, F., Bignell, J. et Thain, J. (2009). Biomarker responses in mussels, an integrated approach to biological effects measurements. *Journal of toxicology and environmental health, Part A*, 72, 196-208
- Bruneau, A., Fortier, M., Gagné, F., Turcotte, P., Tayabali, A., Davis, T.L., Auffret, M. et Fournier, M. (2013). Size distribution effects of cadmium tellurium quantum dots (CdS/CdTe) immunotoxicity on aquatic organisms. *Environmental science: processes & impacts*, 15, 596-607
- Chen, D., Martin, P., Burgess, N.M., Champoux, L., Elliott, J.E., Forsyth, D.J., Idrissi, A. et Letcher, R.J. (2013). European starlings (*Sturnus vulgaris*) suggest that landfills are an important source of bioaccumulative flame retardants to Canadian terrestrial ecosystems. *Environmental science and technology*, 47, 12238-12247
- Cuevas, N., Zorita, I., Costa, P.M., Franco, J. et Larreta, J. (2015). Development of histopathological indices in the digestive gland and gonad of mussels: integration with contamination levels and effects of confounding factors. *Aquatic toxicology*, 162, 152-164

- de Wit, C.A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere*, 46, 583-624.
- Dou, J., Jin, Y., Li, Y., Wu, B. et Li, M. (2015). Potential genotoxicity and risk assessment of a chlorinated flame retardant, Dechlorane plus. *Chemosphere*, 135, 462-466
- Feo, M.L., Barón, E., Eljarrat, E. et Barceló, D. (2012). Dechlorane plus and related compounds in aquatic and terrestrial biota: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404, 2625-2637
- Gagné, F., Bouchard, B., André, C., Farcy, E. et Fournier, M. (2011). Evidence of feminization in wild *Elliptio complanata* mussels in the receiving waters downstream of a municipal effluent outfall. *Comparative biochemistry and physiology, Part C*, 153, 90-106
- Gagné, F., André, C., Fortier, M. et Fournier, M. (2012). Immunotoxic potential of aeration lagoon effluents for the treatment of domestic and hospital wastewaters in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Journal of environmental sciences*, 24, 781-789.
- Gaitán-Espitia, J.D., Quintero-Galvis, J.F., Mesas, A. et D'Elia, G. (2016). Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (bivalvia: pteriomorpha): insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. London: *Nature*, p. 1-10. Doi: 10.1038/srep26853
- Galloway, T.S. et Depledge, M.H. (2001). Immunotoxicity in invertebrates: measurement and ecotoxicological relevance. *Ecotoxicology*, 10, 5-23
- Grabowski, C.T. (1981). Plasma proteins and colloid osmotic pressure of blood of rat fetuses prenatally exposed to mirex. *Journal of toxicology and environmental health*, 7, 705-714
- Hagger, J.A., Depledge, M.H. et Galloway, T.S. (2005). Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine pollution bulletin*, 51, 811-816
- He, M.-J., Luo, X.-J., Wu, J.-P., Chen, S.-J., Wei, S.-Q. et Mai, B.-X. (2014). Isomers of Dechlorane plus in an aquatic environment in a highly industrialized area in southern China: spatial and vertical distribution, phase partition, and bioaccumulation. *Science of the total environment*, 481, 1-6
- Hoh, E., Zhu, L. et Hites, R.A. (2006). Dechlorane plus, a chlorinated flame retardant, in the Great lakes. *Environmental science and technology*, 40, 1184-1189

- Houde, M., Berryman, D., de Lafontaine, Y. et Verreault, J. (2014). Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence river, Canada. *Science of the total environment*, 479-480, 48-56
- Hu, F., Pan, L., Xiu, M. et Jin, Q. (2015). Exposure of *Chlamys farreri* to tetrabromobisphenol A: accumulation and multibiomarker responses. *Environmental science & pollution research*, 22(16), 12224-12234
- International Programme on Chemical Safety: *Environmental health, criteria 44, mirex*. (1984) Récupéré le 15 juin 2016 de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc44.htm>
- Iqbal, M., Syed, J.H., Katsoyiannis, A., Malik, R.N., Farooqi, A., Butt, A., Li, J., Zhang, G., Cincinelli, A. et Jones, K.C. (2017). Legacy and emerging flame Retardants (FRs) in the freshwater ecosystem : A review. *Environmental research*, 152, 26-42
- Jia, H., Sun, Y., Liu, X., Yang, M., Wang, D., Qi, H., Shen, L., Sverko, E., Reiner, E.J. et Li, Y.-F. (2011). Concentration and bioaccumulation of Dechlorane compounds in coastal environment of northern China. *Environmental science and technology*, 45, 2613-2618
- Kaiser, K.L.E. (1978). The rise and fall of mirex. *Environmental science and technology*, 12(5), 520-528
- Klosterhaus, S.L., Stapleton, H.M., La Guardia, M.J. et Greig, D.J. (2012). Brominated and chlorinated flame retardants in San Francisco bay sediments. *Environment international*, 47, 56-65
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., Mainor, T.M. et Ciparis, S. (2012). *In situ* accumulation of HBCD, PBDEs, and several alternative flame retardants in the bivalve (*Corbicula fluminea*) and gastropod (*Elimia proxima*). *Environmental science and technology*, 46, 5798-5805
- Lemiere, S., Cossu-Leguille, C., Charissou, A.-M. et Vasseur, P. (2005). DNA Damage (comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Biomarkers*, 10(1), 41-57.
- Li, W., Zhu, L., Zha, J., Wang, Z. (2011). Effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on mRNA transcription of thyroid hormone pathway and spermatogenesis associated genes in chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*). *Environmental Toxicology*, 9(1), 1-9.

- Liu, L.-Y., Salamova, A., Venier, M. et Hites, R.A. (2016). Trends in the levels of halogenated flame retardants in the Great lakes atmosphere over the period 2005-2013. *Environment international*, 92-93, 442-449
- Liu, J., Pan, L.-Q., Zhang, L., Miao, J., Wang, J. (2009). Immune response, ROS generation and the haemocyte damage of scallop *Chlamys farreri* exposed to Aroclor 1254. *Fish and Shellfish Immunology*, 26, 422-428.
- Lv, Q.-Y., Wan, B., Guo, L.-H. et Yang, Y. (2015). *In vitro* immune toxicity of polybrominated diphenyl ethers on murine peritoneal macrophages: apoptosis and immune cell dysfunction. *Chemosphere*, 120, 621-630
- Martínez, G. et Rivera, A. (1994). Role of the monoamines in the reproductive process of *Argopecten purpuratus*. *Invertebrate reproduction and development*, 25(2), 167-174
- Matsutani, T. et Nomura, T. (1987). *In vitro* effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *General and comparative endocrinology*, 67, 111-118
- Möller, A., Xie, Z., Sturm, R. et Ebinghaus, R. (2010). Large-scale distribution of Dechlorane plus in air and seawater from the Arctic to Antarctica. *Environmental science and technology*, 44, 8977-8982
- Peng, Y., Wu, J.-P., Tao, L., Mo, L., Zheng, X.-B., Tang, B., Luo, X.-J. et Mai, B.-X. (2015). Accumulation of Dechlorane plus flame retardant in terrestrial passerines from a nature reserve in south China: the influences of biological and chemical variables. *Science of the total environment*, 514, 77-82
- Qiu, X., Marvin, C.H. et Hites, R.A. (2007). Dechlorane plus and other flame retardants in a sediment core from lake Ontario. *Environmental science and technology*, 41, 6014-6019
- Rittschof, D. et McClellan-Green, P. (2005). Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Marine pollution bulletin*, 50, 369-373
- Rowley, A. et Powell, A. (2007). Invertebrate immune systems-specific, quasi-specific or nonspecific? *The journal of immunology*, 179, 7209-7214
- Seed, R. (2009). Ecology, dans B.L. Bayne (dir.), *Marine mussels: their ecology and physiology*, (première édition, 13-65). New York: Cambridge university press.

- Shoeib, M., Harner, T., Webster, G.M., Sverko, E et Cheng, Y. (2012). Legacy and current-use flame retardants in house dust from Vancouver, Canada. *Environment pollution*, 169, 175-182
- Shen, L., Reiner, E.J., Macpherson, K.A., Kolic, T.M., Sverko, E., Helm, P.A., Bhavsar, S.P., Brindle, I.D. et Marvin, C.H. (2010). Identification and screening analysis of halogenated norbornene flame retardants in the Laurentian Great lakes: Dechloranes 602, 603 and 604. *Environmental science and technology*, 44, 760-766
- Shugart, L.R. (2000). DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology*, 9, 329-340
- Siddiqi, M.A., Laessig, R.H. et Reed, K.D. (2003). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): new pollutants-old disease. *Clinical medicine & research*, 4, 281- 290
- Smith, W.L. et Langenbach, R. (2001). Why there are two cyclooxygenase isoenzymes. *The journal of clinical investigation*, 107(12), 1491-1495
- Sührling, R., Freese, M., Schneider, M., Schubert, S., Pohlmann, J.-D., Alae, M., Wolschke, H., Hanel, R., Ebinghaus, R. et Marohn, L. (2015). Maternal transfer of emerging brominated and chlorinated flame retardants in European eels. *Science of the total environment*, 530-531, 209-218.
- Sun, J., Zhang, A., Fang, L., Wang, J., Liu, W. (2013). Levels and distribution of Dechlorane plus and related compounds in surficial sediments of the Qiantang river in eastern China: the results of urbanization and tide. *Science of the total environment*, 443, 194-199
- Sun, R.-X., Luo, X.-J., Tan, X.-X., Tang, B., Li, Z.-R., Mai, B.-X. (2015). Legacy and emerging halogenated organic pollutants in marine organisms from the Pearl River Estuary, South China. *Chemosphere*, 139, 565-571
- Sun, R., Luo, X., Tang, B., Li, Z., Wang, T., Tao, L. et Mai, B. (2016). Persistent halogenated compounds in fish from rivers in the Pearl river delta, south China: geographical pattern and implications for anthropogenic effects on the environment. *Environmental research*, 146, 371-378
- Sverko, E., Reiner, E.J., Tomy, G.T., McCrindle, R., Shen, L., Arsenault, G., Zaruk, D., MacPherson, K.A., Marvin, C.H., Helm, P.A. et McCarry, B.E. (2010). Compounds structurally related to Dechlorane plus in sediment and biota from lake Ontario (Canada). *Environmental science and technology*, 44, 574-579

- Sverko, E., Tomy, G.T., Reiner, E.J., Li, Y.-F., McCarry, B.E., Arnot, J.A., Law, R.J., Hites, R.A. (2011). Dechlorane plus and related compounds in the environment: a review. *Environmental Science and Technology*, 45, 5088- 5098
- Tomy, G.T., Pleskach, K., Ismail, N., Whittle, M., Helm, P.A., Sverko, E., Zaruk, D. et Marvin, C.H. (2007). Isomers of Dechlorane plus in lake Winnipeg and lake Ontario food webs. *Environmental science and technology*, 41, 2249-2254
- Tomy, G.T., Thomas, C.R., Zidane, T.M., Murison, K.E., Pleskach, K., Hare, J., Arsenaault, G., Marvin, C.H. et Sverko, E. (2008). Examination of isomer specific bioaccumulation parameters and potential *in vivo* hepatic metabolites of *syn*- and *anti*-Dechlorane plus isomers in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental science and technology*, 42, 5562- 5567
- United Nations environment programme (UNEP). (2004, 17 mai). *Entrée en vigueur de la Convention avec les 12 premiers produits chimiques inscrits aux annexes A, B et/ou C de la convention: le mirex*, récupéré le 15 juin 2016 de <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx>
- United Nations environment programme (UNEP). (2013, 14-18 octobre). Étude des produits chimiques nouvellement proposés pour inscription aux annexes A, B et/ou C de la Convention: le décabromodiphényléther (mélange commercial, décaBDE), 9^e réunion, récupéré le 15 juin 2016 de <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ChemicalsProposedforListing/tabid/2510/Default.aspx>
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. et Scoullos, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 64, 178- 189
- Villaverde-de-Sáa, E., Valls-Cantenys, C., Quintana, J.B., Rodil, R. et Cela, R. (2013). Matrix solid-phase dispersion combined with gas chromatography- mass spectrometry for the determination of fifteen halogenated flame retardants in mollusks. *Journal of Chromatography A*, 1300, 85-94
- Vorkamp, K., Bossi, R., Rigét, F.F., Skov, H., Sonne, C. et Dietz, R. (2015). Novel brominated flame retardants and Dechlorane plus in Greenland air and biota. *Environmental pollution*, 196, 284-291
- Wang, J., Tian, M., Chen, S.-J., Zheng, J., Luo, X.-J., An, T.-C. et Mai, B.-X. (2011). Dechlorane plus in house dust from e-waste recycling and urban areas in south China: sources, degradation, and human exposure. *Environmental toxicology and chemistry*, 30(9), 1965-1972

- Wang, D.-G., Guo, M.-X., Pei, W., Byer, J.D., Wang, Z. (2015). Trophic magnification of chlorinated flame retardants and their dechlorinated analogs in a fresh water food web. *Chemosphere*, 118, 293-300
- Wang, P., Zhang, Q., Zhang, H., Wang, T., Sun, H., Zheng, S., Li, Y., Liang, Y. et Jiang, G. (2016). Sources and environmental behaviors of Dechlorane plus and related compounds-a review. *Environment international*, 88, 206-220
- Woo, S., Denis, V., Won, H., Shin, K., Lee, G., Lee, T.-K. et Yum, S. (2013). Expressions of oxidative stress-related genes and antioxidant enzyme activities in *Mytilus galloprovincialis* (bivalvia, mollusca) exposed to hypoxia. *Zoological studies*, 52(15)
- Xian, Q., Siddique, S., Li, T., Feng, Y.-l., Takser, L., Zhu, J. (2011). Sources and environmental behavior of dechlorane plus - A review. *Environment International*, 37, 1273-1284.
- Xiang, N., Chen, L., Meng, X.-Z., Li, Y.-L., Liu, Z., Wu, B., Dai, L. et Dai, X. (2014). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and Dechlorane plus (DP) in a conventional wastewater treatment plant (WWTP) in Shanghai: seasonal variations and potential sources. *Science of the total environment*, 487, 342- 349
- Zhang, Y., Luo, X.-J., Wu, J.-P., Liu, J., Wang, J., Chen, S.-J. et Mai, B.-X. (2010). Contaminant pattern and bioaccumulation of legacy and emerging organohalogen pollutants in the aquatic biota from an e-waste recycling region in south China. *Environmental toxicology and chemistry*, 29(4), 852-859
- Zhang, Y., Wu, J.-P., Luo, X.-J., Wang, J., Chen, S.-J., Mai, B.-X. (2011). Tissue distribution of Dechlorane plus and its dechlorinated analogs in contaminated fish: high affinity to the brain for anti-DP. *Environmental Pollution*, 159, 3647-3652
- Zhu, J., Feng, Y.-L. et Shoeib, M. (2007). Detection of Dechlorane plus in residential indoor dust in the city of Ottawa, Canada. *Environmental science and technology*, 41, 7694-7698